

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

PAR

Madame Nicole GENTY- AIMÉ

PREMIÈRE THÈSE

Contribution à l'étude de l'oxydation
de l'acide ascorbique par l'oxygène moléculaire
en présence de bleu de méthylène

DEUXIÈME THÈSE

Structure cellulaire et régulation du métabolisme oxydatif

Soutenues le 22 Juillet 1961 devant la Commission d'Examen

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

PAR

Madame Nicole GENTY-AIMÉ

PREMIÈRE THÈSE



Contribution à l'étude de l'oxydation
de l'acide ascorbique par l'oxygène moléculaire
en présence de bleu de méthylène

DEUXIÈME THÈSE

Structure cellulaire et régulation du métabolisme oxydatif

Soutenues le 22 Juillet 1961 devant la Commission d'Examen

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

DOYEN

M. ROUBAULT

ASSESEUR

M. WAHL

DOYENS HONORAIRES

MM. CORNUBERT, DELSARTE, URION

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. GUTTON, CROZE, RAYBAUD, LAFFITTE, LERAY, JOLY, LAPORTE, EICHHORN, CAPELLE, GODEMENT, DUBREIL, L. SCHWARTZ, DIEUDONNE, de MALLEMANN, LONGCHAMBON, LETORT, DODE, GAUTHIER, GOUDET, OLMER, CORNUBERT, CHAPELLE, GUERIN.

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

MM. RAUX, LIENHART

PROFESSEURS

MM.			
URION	Chimie biologique	FRUHLING	Physique
DELSARTE	Analyse supérieure	LIONS	M. M. P.
ROUBAULT	Géologie	SUHNER	Physique exp.
VEILLET	Biologie animale	HILLY	Geologie
ECHEVIN	Botanique	LE GOFF	Génie chimique
WAHL	Chimie Org. indust.	CHAPON	Chimie biologique
BARRIOL	Chimie théorique	HEROLD	Chimie indust.
BIZETTE	Physique	SCHWARTZ	Exploit. minière
GULLIEN	Electronique	GAYET	Physiologie
GIBERT	Chimie Physique	MANGENOT	Phytopathologie
HERVE	Calcul diff. et Int.	MALAPRADE	Chimie
LEGRAS	Mécanique rationnelle	HADNI	Physique
DAVID	Chimie organique	DELAMARE-	
BOLFA	Minéralogie	DEBOUTEVILLE	Zoologie
NICLAUSE	Chimie	BONVALET	Mécanique physique
FAIVRE	Physique appliquée	BRUHAT	Mathématiques gén.
AUBRY	Chimie minérale	Me ROIZEN	Physique
DUVAL	Chimie	KERN	Minéralogie
COPPENS	Radiogéologie	BASTICK	Chimie

MAITRES DE CONFERENCES

MM.			
WERNER	Botanique	CLIN	Paléontologie
GARNIER	Agronomie	ROCCI	Géologie
REGNIER	Physico-chimie	WEISS	Physique M. P. C.
WEPPE	Minéralogie appli.	Me BASTICK	Chimie M. P. C.
BERNARD	Géologie	VUILLAUME	Psychophysiologie
ARAGNOL	Mathématiques (prop.)	PLAN	Mathématiques
RENARD	Physique théo. et nuc.	GUDEFIN	Physique
CONDE	Zoologie	MARI	Chimie I. S. I. N.
GOSSE	Génie chimique	LAFON	Physique I. S. I. N.
CHAMPIER	Physique	HORN	Physique
GAY	Chimie biologique	PIERRET	Maître de conf. adj.

SECRETAIRE

M. CARON

A MES PARENTS

A MON MARI

A MES MAITRES



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Le présent travail m'a été proposé par Monsieur L. CHAPON, Professeur de chimie biologique à la Faculté des Sciences de NANCY, et a été réalisé entièrement dans son laboratoire à l'Ecole de Brasserie au cours des années 1956-1959.

Je suis heureuse d'exprimer ici à mon maître mes plus sincères remerciements pour les conseils et les suggestions qu'il m'a prodigués, pour l'aide qu'il m'a apportée dans la poursuite de ces recherches et pour l'intérêt constant qu'il a manifesté pour ce travail.

Je remercie vivement Monsieur le Doyen E. URION, Professeur de chimie biologique, Directeur de l'Ecole de Brasserie pour son accueil bienveillant et pour les conseils éclairés qu'il a bien voulu me prodiguer.

Je prie Monsieur J. GAYET, Professeur de Physiologie générale d'agréer l'expression de ma profonde gratitude pour avoir accepté de faire partie du jury.

Je tiens à exprimer mes sentiments de vive reconnaissance à Madame S. CHAPON, Chef de travaux pratiques de chimie biologique pour les conseils et l'aide qu'elle n'a cessé de m'apporter tout au long de ces recherches.

Je garde le meilleur souvenir de l'équipe du laboratoire de recherches de l'Ecole de Brasserie, et tout particulièrement de Madame J. BAYEUL dont la collaboration m'a été très utile.

Je suis heureuse d'exprimer ici à mon mari, ingénieur E.N.S.I.C. ma profonde reconnaissance pour les encouragements et les conseils qu'il m'a donnés pour la réalisation de ce travail.

INTRODUCTION

I - ORIGINE DE NOS TRAVAUX

Le travail présenté ici s'insère dans une étude beaucoup plus générale sur les phénomènes d'oxydoréduction, commencée il y a quelques années et poursuivie activement à l'école de Brasserie dans le Laboratoire de Recherches de Monsieur CHAPON.

La connaissance des mécanismes par lesquels l'oxygène moléculaire devient l'accepteur final de l'hydrogène dans les oxydations cellulaires a fortement progressé lorsque les potentiels rédox de nombreux systèmes du métabolisme intermédiaire ont pu être mesurés avec précision.

Deux techniques sont utilisées concurremment : l'une, électrométrique, mesure le potentiel que prend une électrode de platine brillant, électriquement isolée, dans un milieu en équilibre ; l'autre, colorimétrique, est basée sur l'emploi de systèmes rédox particuliers, les indicateurs colorés, ayant la propriété de se mettre en équilibre avec le système auquel ils sont ajoutés en très faible quantité. Le bleu de méthylène (BM) occupe une place de choix en chimie biologique, en raison d'une part du pouvoir colorant très élevé de la forme oxydée (alors que le leuco dérivé (BMH₂) est incolore), et d'autre part de la position dans l'échelle des potentiels entre oxydants doux et réducteurs énergiques ($E_{pH7} = + 0,011$ V). Il a été intensivement utilisé pour l'étude des déshydrases par THUNBERG.

Le sujet du présent travail a été inspiré par des observations faites au cours d'une étude sur la mesure du pouvoir réducteur des bières grâce au bleu de méthylène (128). De CLERCK, qui a introduit en Brasserie la notion de rédox, a montré que la bière décolore progressivement de petites quantités de BM (138). Le temps nécessaire à la réduction du colorant varie selon l'échantillon de quelques heures à plusieurs jours, et dépend d'une part de la richesse de la bière en substances réductrices, et d'autre part de la quantité d'oxygène présent (air dissous ou enfermé dans le col de la bouteille). La connaissance du pouvoir réducteur présente quelque intérêt au point de vue pratique car d'une façon générale une bière à pouvoir réducteur élevé conserve plus longtemps ses qualités initiales. Ces observations ont conduit les techniciens brasseurs à minimiser les conséquences néfastes de l'oxydation en enrichissant la bière en substances réductrices, soit par l'emploi de méthodes appropriées de brassage, soit par l'addition au dernier moment de réducteurs dont les sulfites et les ascorbates sont les plus utilisés. (49) Si l'on ajoute un peu d'acide ascorbique (AH₂) à de la bière, on constate

en effet que le temps de réduction du BM se trouve considérablement raccourci. La décoloration est totale dans la masse du liquide mais partielle dans la zone en contact avec l'air.

Cherchant à interpréter ces phénomènes, Monsieur CHAPON a remarqué que des bières additionnées des mêmes quantités d' AH_2 et de BM et saturées d'air par agitation, prennent des colorations plus ou moins intenses, relativement stables pendant quelques minutes. L'intensité de la coloration varie avec l'éclairement ; à l'obscurité les solutions sont plus colorées qu'à la lumière ; ce phénomène apparaît à première vue comme photo-reversible.

Dans ce milieu en évolution dont les réactifs sont l' AH_2 , le BM, l'oxygène moléculaire et certains constituants de la bière on ne pouvait s'attendre à ce que le rapport BM/BMH₂, aisément accessible par colorimétrie, caractérise le niveau rédox du milieu. Toutefois la quantité de BM oxydé apparaissait liée à une caractéristique de la bière.

Connaissant la sensibilité de l' AH_2 à la catalyse d'oxydation par les métaux lourds, et en particulier par le cuivre, Monsieur CHAPON pensa que la coloration devait être liée au pouvoir catalytique que présentait la bière sur l'oxydation de l' AH_2 . En effet l'enrichissement de la bière en cuivre se traduisait par une augmentation de coloration due au BM oxydé. Les essais furent alors poursuivis sur un milieu de composition plus simple : solutions d' AH_2 et de BM auxquelles le cuivre était ajouté comme catalyseur d'oxydation, à des concentrations connues. Il s'avéra très vite que ces solutions étaient particulièrement sensibles au cuivre, de sorte que ce problème méritait une étude approfondie. Faisons tout d'abord le point des connaissances actuelles sur l'oxydation de l'acide ascorbique.

II - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A - IMPORTANCE DE L'ACIDE ASCORBIQUE

En 1928, SZENT GYORGYI (119) isole l'acide hexuronique des cortico-surrénales. L'intérêt de cette substance s'accroît considérablement, quand en 1932, ce savant (121) l'identifie à la vitamine C, vitamine antiscorbutique, d'où son nom actuel d'acide ascorbique.

La propriété antiscorbutique de l'acide hexuronique est d'ailleurs mise en évidence au même moment par d'autres biologistes (135, 52). La même année, HAWORTH, HIRST et leurs collaborateurs (53, 54) élucident la structure de l' AH_2 (fig.1 a) et en font la synthèse.

C'est une vitamine pour les primates et le cobaye, principalement fournie par les aliments d'origine végétale, mais non pour les autres vertébrés qui en font la synthèse à partir du glucose. Dès 1931, SZENT GYORGYI pensait que l'importance de ce corps était liée à son pouvoir réducteur remarquable et le considérait comme transporteur d'hydrogène. En effet, l'acide ascorbique semble former avec son produit d'oxydation réversible, l'acide déhydroascorbique, (A) un des systèmes qui maintiennent l'équilibre rédox nécessaire aux interactions harmonieuses des oxydations et réductions cellulaires, sans qu'on puisse à l'heure actuelle préciser exactement la nature de son intervention.

En vertu de ses intéressantes propriétés pharmacodynamiques, qu'il n'est pas dans notre intention d'étudier ici, il entre dans la composition d'un

très grand nombre de spécialités pharmaceutiques. En raison de ses propriétés réductrices énergiques, il a trouvé un débouché important comme antioxydant, dans les industries de l'alimentation et notamment en brasserie (49) .

Le nombre des publications concernant cette vitamine dans les domaines biologique, médical, pharmaceutique, alimentaire étant considérable, nous nous sommes limités aux travaux se rapportant à son oxydation.

B - HISTORIQUE DES TRAVAUX CONCERNANT L'OXYDATION D'AH₂

A l'état cristallisé, l'acide ascorbique reste inaltéré au contact de l'air. En solution aqueuse, il n'est stable qu'en l'absence d'air, car il est capable de fixer l'oxygène à la température ordinaire.

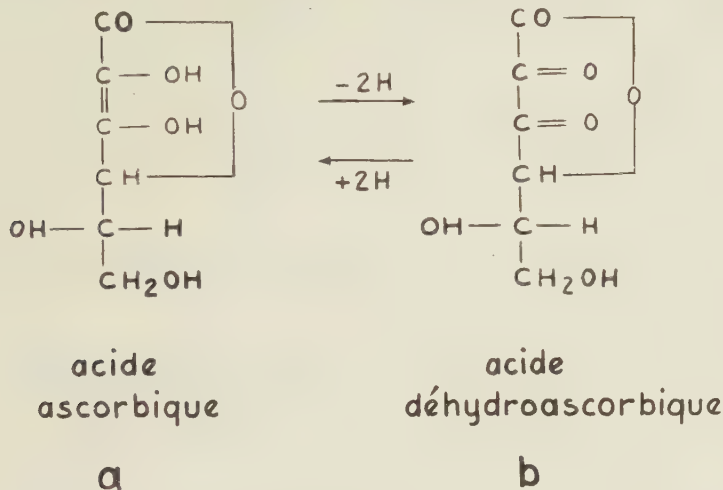


Fig.1 - Oxydation de la vitamine C

La facilité d'oxydation de l'acide ascorbique domine toutes ses propriétés. Par perte de deux atomes d'hydrogène, il donne l'acide déhydroascorbique (fig.1 b) avec lequel il forme un système rédox réversible. Cependant l'acide déhydroascorbique en solution est une substance instable, (125) (66) (4) dont la durée de vie serait de 23 heures à pH 3,2 et de 35 minutes à pH 7,2 (93). Suivant les conditions, ses produits de décomposition sont l'acide 2,3 dicétogulonique (54), la xylosone (93), l'acide oxalique et l'acide thréonique (101) (70) (11). Il en résulte que les propriétés antiscorbutiques de la vitamine C disparaissent si le stade acide déhydroascorbique est dépassé.

En solution, l'AH₂ s'oxyde avec une telle facilité que certains chimistes lui attribuèrent la faculté de s'oxyder spontanément, soit de "s'autoxyder". Mais remarquant l'extrême sensibilité de l'AH₂ vis à vis de certains catalyseurs, bien des auteurs pensèrent que cette autoxydation n'était qu'une oxydation catalysée par des traces indécélables de métaux lourds. Le mécanisme de l'oxydation de la vitamine C fut le sujet de nombreuses recherches.

C'est en 1921 que HESS et UNGER (55) observent la destruction de la vitamine C par le cuivre présent dans les aliments.

En 1933 EULER, MYRBACK et LARSON (29) étudient l'effet de concentrations croissantes de cuivre sur la vitesse de disparition de l'AH₂.

En 1934, DE CARO et GIANI (21) inhibent l'action catalytique du cuivre par du glutathion et de la cystéine ; ils expliquent l'existence de vitamine C à l'état réduit dans l'organisme par la présence de ces substances protectrices.

En 1935, KELLIE et ZILVA (66) étudient l'action catalytique du cuivre, du fer, du manganèse et du nickel sur l'oxydation de l' AH_2 ; ils démontrent que son autoxydation est freinée si l'eau utilisée à la préparation des solutions a été distillée plusieurs fois dans des appareils de verre.

La même année, BARRON, DE MEIO et KLEMPERER (4) étudient l'effet du pH sur l'autoxydation de l' AH_2 ainsi que l'action des catalyseurs positifs. Leurs recherches, menées avec beaucoup de soin, leur permettent de montrer que l'autoxydation ne peut être considérée comme effective qu'en solution basique. Ils mettent en évidence l'extraordinaire pouvoir catalytique du cuivre qui, à des concentrations aussi faibles que $46 \mu g$ par litre, se révèle capable d'entraîner une oxydation mesurable. Par contre, le fer, le manganèse, le nickel, le cobalt et le calcium leur apparaissent sans action sur les solutions de vitamine C. Quant au mécanisme de l'oxydation, BARRON, DE MEIO et KLEMPERER pensent que le catalyseur dans son état oxydé est réduit par AH_2 , pour être ensuite réoxydé par l'oxygène en solution, le catalyseur poursuivant son rôle de transporteur d'électrons de l' AH_2 vers l'oxygène jusqu'à ce que tout l' AH_2 soit oxydé.

C'est également en 1935 que TAUBER, KLEINER et MISHKIND (122) isolent du péricarpe de cucurbita maxima un enzyme capable d'oxyder la vitamine C, l'acide-ascorbique-oxydase.

Les travaux concernant l'oxydation de l' AH_2 par l'intermédiaire de catalyseurs métalliques ou enzymatiques n'ont alors cessé de se multiplier depuis 25 ans.

C - PROBLEMES POSES PAR L'ETUDE DE L'OXYDATION DE L' AH_2

En poursuivant nos recherches bibliographiques nous avons été frappés par la diversité des résultats concernant certaines questions telles que : l'autoxydation de l' AH_2 , l'influence du pH et des catalyseurs métalliques sur la stabilité des solutions de vitamine C, la quantité d'oxygène fixé au cours de ces oxydations, la réversibilité du système A/AH_2 , l'apparition d'eau oxygénée.

Nous allons passer en revue ces différentes questions :

1/ Autoxydation de l' AH_2

Il n'est pas facile de comparer les résultats des travaux relatifs à l'autoxydation de l' AH_2 , car le phénomène a été généralement étudié dans des conditions différentes, notamment en ce qui concerne la concentration en AH_2 (67) (111), la température, la nature des tampons, le degré de pureté de l' AH_2 ; l' AH_2 naturel employé par certains chercheurs peut être accompagné de substances capables d'exercer, même à très faible concentration, une influence considérable, soit en activant l'oxydation de l' AH_2 , soit en inhibant l'action catalytique des traces de métaux. Le soin apporté aux différentes manipulations, la pureté de l'eau et des réactifs, la propreté de la vaisselle influent grandement sur les résultats.

DE CARO et GIANI (21), EULER MYRBACK et LARSON (29) signalent en effet que l'autoxydation est irrégulière et non reproductible.

Pour MAWSON (85), KELLIE et ZILVA (66), BARRON, DE MEIO et KLEMPERER (4), GERO (40) cette autoxydation serait une catalyse par métaux lourds puisque l' AH_2 s'avère relativement stable dans de l'eau soigneusement bidistillée.

CZUROS et PETRO (18), GOSH et RAKSHIT (47) affirment que l' AH_2 est réellement autoxydable dès pH 3,5 alors que la plupart des auteurs (134) (84) (101) (41), ne reconnaissent une autoxydation qu'en milieu basique.

2/ Action du cuivre sur l' AH_2

L'extraordinaire sensibilité de l' AH_2 aux ions cuivre est repérée avec plus ou moins de précision. Pour BARRON des doses de cuivre de l'ordre de 46 μg par litre suffisent à entraîner l'oxydation de l' AH_2 . L'effet catalytique du cuivre a été observé pour des concentrations encore plus faibles : 10 μg /litre pour GRUSHKO (50) 6,3 μg /litre pour GERO et LE GALLIC (42) 1 μg /litre pour GRAB. (48).

SIEFFERT (112) affirme que 142.10⁻⁶ μg de cuivre ont encore une action catalytique sur l'oxydation d'une solution renfermant 500 mg d' AH_2 par litre, ce qui représente un rapport de concentration de l'ordre de 3,10⁻¹⁰ entre catalyseur et substrat.

En 1955, HIDEHIRO GOTO et SHIGORO IKEDA (111) utilisent l'activité catalytique du cuivre sur l'oxydation de l' AH_2 pour doser ce métal. Leur technique expérimentale permet de détecter de 1 à 20 μg de cuivre.

3/ Action des autres cations

Mise à part l'action du fer rarement contestée (4), (59) (77) l'influence des autres cations sur l'oxydation de l' AH_2 est très discutée. C'est dans ce domaine que nous avons rencontré le plus de contradictions. Nous ne nous étendrons pas sur ces résultats dont la diversité repose sur la pureté de l' AH_2 utilisé, sur la contamination difficilement contrôlable des solutions par des traces impondérables de catalyseurs ou d'inhibiteurs, indépendamment du soin apporté aux recherches.

4/ Quantité d'oxygène fixé

La quantité d'oxygène fixé au cours de l'oxydation des solutions d' AH_2 , en présence de cuivre, à pH acide, correspond d'après BARRON à la quantité théorique : 1 atome d'oxygène pour 1 molécule d' AH_2 . Pour d'autres auteurs (78) (129) (116) (22) (76) elle est toujours comprise entre 1 et 2 atomes d'oxygène par molécule d' AH_2 .

On obtiendrait une fixation rigoureusement égale à 1 atome d'oxygène par molécule dans le cas où l'acide ascorbique oxydase assurerait l'oxydation (33) ou dans celui où la catalase coopérerait avec le cuivre (78) (22). L'excédent d'oxygène absorbé au cours de l'oxydation de l' AH_2 en présence de catalyseurs minéraux pourrait servir à la formation d'eau oxygénée.

5/ Formation d'eau oxygénée

L'apparition d'eau oxygénée au cours de l'oxydation catalytique de l' AH_2 a été postulée par BARRON. Bien des chercheurs ont tenté de vérifier cette hypothèse en utilisant les divers procédés suivants :

- oxydation des sels céreux en sels cériques oranges selon la technique de WIELAND, HUSZAK (1937) (61) EBIHARA (1938) (27)

- réaction de luminescence avec le luminol (hydrazide de l'acide 3 amino-phthalique), HOLTZ et TRIEM (1937) (58).

- action de la catalase, STEINMANN et DAWSON (1942) (116)

- formation d'acide perchromique bleu, CALCUTT (1951) (12)

- oxydation du sulfate de titane avec formation de sels pertitaniques jaunes, CALCUTT (1951) (12).

- oxydation de l'iodure en milieu acide, HUSZAK (1935) (61) STEINMANN et DAWSON 1942 (116), KAUFMANN (1951), (64) UDENFRIEND et Coll. (1954) (127).

Tous ces tests conduisent avec plus ou moins de netteté à des réactions positives. Mais il convient de remarquer avec la plupart de ces auteurs que ces techniques ne sont pas spécifiques de l'eau oxygénée mais qu'elles répondent aussi bien aux substances de nature peroxydique.

D'après BARRON, l'eau oxygénée se produirait au cours de l'oxydation des ions cuivreux par l'oxygène mais de façon fugace car elle se décomposerait spontanément en eau et oxygène.

Certains auteurs (28) pensent que cette eau oxygénée pourrait servir à l'oxydation couplée d'autres constituants du milieu.

D'après FLITMAN et FRIEDEN (33) DAWSON (20) il ne se produit pas d'eau oxygénée quand la catalyse est assurée par l'acide ascorbique oxydase. Mais EBIHARA (27) affirme qu'il s'en forme également dans ce cas.

6/ Réversibilité du système acide ascorbique - acide déhydroascorbique

La réversibilité du système acide ascorbique/acide déhydro-ascorbique a été étudiée par TILLMANS et Coll. (125), KELLIE et ZILVA, BARRON ; tous s'accordent sur un point, à savoir que l'oxydation de la vitamine C par l'oxygène atmosphérique n'est que partiellement réversible ; un traitement du produit d'oxydation par SH_2 ne permet pas de recouvrer en totalité l'acide ascorbique utilisé ; le rendement de la réduction est d'autant meilleur que le pH auquel a été réalisé l'oxydation est plus bas (4) et que l'expérience a été plus brève (66).

BORSOOK et KEIGHLEY (8) pensent que cette irréversibilité est à l'origine de la difficulté où l'on se trouve de mesurer le potentiel thermodynamique du système A/AH_2 en solution à $\text{pH} > 6$.

7/ Inhibition de l'activité catalytique du cuivre

Afin de prévenir l'effet nocif du cuivre dans des solutions d'acide ascorbique, les chimistes et les pharmaciens cherchèrent à stabiliser ces solutions en y ajoutant des produits susceptibles de former avec le cuivre des complexes dépourvus d'action oxydasique.

Les biologistes ont pensé que la vitamine C que l'on rencontre à l'état réduit dans les tissus y était protégée contre l'oxydation. DE CARO et GIANI (21) MAWSON (85) KELLIE et ZILVA (66) stabilisent en effet des solutions d'acide ascorbique par addition d'extraits de tissus animaux, SOMOGYI (113) met en évidence dans le citron, l'orange, le persil, la tomate et le poireau, des substances protectrices de la vitamine C. Certains constituants normaux des bières inhibent également l'action catalytique du cuivre sur l'oxydation de la vitamine C (129) (106) (130).

Bien qu'il n'ait pas été possible dans tous les cas d'identifier les inhi-

biteurs de l'oxydation spontanée de l'acide ascorbique dans les tissus vivants, DE CARO et GIANI montrent que la glutathion figure parmi eux.

Ultérieurement ce corps a souvent été utilisé à la protection de solutions de vitamine C (85) (13) (43) ; ainsi que d'autres substances contenant le groupement SH dont la tendance à fixer le cuivre est bien connue (76) (48), en particulier la cystéine (21) (85) (30) (101) (60) (43) (97), la thiourée (65) (60) (137) (13) (43) (35) le diéthyl dithio carbamate (30) (46) (48) (12).

Bien d'autres complexants du cuivre ont été utilisés comme agents de protection de solutions de vitamine C tels que les complexons (33) (63), la cuproïne (33), des acides aminés (10) (101) (46) (60) (36) (37), la vitamine B₁ (44) (45), la vitamine P (39) et la provitamine A (2).

On conçoit aisément que la mesure des vitesses d'oxydation de l'acide ascorbique puisse être perturbée par la présence indésirable de molécules étrangères susceptibles de fixer le cuivre ; or il ne semble pas que les auteurs qui ont étudié l'oxydation catalytique de l'AH₂ se soient préoccupés de cette question. Seul SCHUMMER (109) remarque que malgré des conditions expérimentales apparemment identiques, les résultats de ses essais d'oxydation s'écartent les uns des autres de façon souvent importante. Il s'aperçut que des traces de fumée de tabac ou de gaz d'éclairage suffisaient à empoisonner la catalyse.

D - ACIDE ASCORBIQUE ET BLEU DE METHYLENE

MARTINI et BONSIGNORE (79) (80) (7) ont montré que le bleu de méthylène était réduit par l'AH₂ sous forte insolation lumineuse (lumière solaire ou puissante lampe à incandescence) mais qu'à l'obscurité la réduction du colorant n'était que partielle.

STRAUB (117) remarqua que la réduction du BM par AH₂ se faisait spontanément mais qu'elle pouvait être accélérée par la présence d'ions cuivre ; la vitesse de réduction spontanée est fortement accrue par la lumière, la réduction catalysée par le cuivre n'y est que très peu sensible. Travaillant sous azote STRAUB ne remarqua pas l'extrême sensibilité au cuivre des solutions d'AH₂ et BM en présence d'oxygène, sur laquelle repose tout notre travail.

PRÉSENTATION DES RÉSULTATS DE NOS RECHERCHES INTERPRÉTATION DES PHÉNOMÈNES

L'expérience préliminaire : Une solution d' AH_2 à laquelle on a ajouté un peu de BM est incolore sous azote, le colorant étant entièrement réduit par AH_2 . Lorsque la solution est saturée d'air en permanence, il s'établit une légère coloration bleue, que l'on peut attribuer à une très lente oxydation.

A l'addition de quelques μg d'ions cuivriques la coloration fonce fortement, reste constante quelques minutes, puis s'éclaircit lentement. La présence de cuivre, dont on connaît le pouvoir catalytique sur l'oxydation de solution d' AH_2 , accélère la vitesse d'absorption d'oxygène provoquant une augmentation de teinte.

Si à cette solution contenant des traces de cuivre on ajoute une substance inhibitrice d'oxydation (par exemple le glutathion réduit) on observe une décoloration presque totale. L'inhibiteur forme avec le cuivre un complexe dépourvu d'activité catalytique sur l'oxydation de la solution, ce qui entraîne une diminution de la vitesse d'absorption d'oxygène et corrélativement un affaiblissement de la coloration.

Le BM ajouté à une solution d' AH_2 , semble jouer le rôle d'intermédiaire dans l'oxydation de cette solution en présence de traces de cuivre. Ceci permet d'envisager l'étude des phénomènes d'oxydation par simple mesure colorimétrique.

Cette expérience préliminaire peut aisément être représentée par la courbe de transmission en fonction du temps obtenue en lumière rouge au moyen d'un photomètre. (fig.2) Nous nous proposons d'élucider les phénomènes qui gouvernent la forme d'une telle courbe.

Quand Monsieur CHAPON nous confia le soin de ces recherches un certain nombre d'essais d'orientation avaient été effectués, ce qui nous permit d'aborder directement la question. On disposait d'une solution sensible au cuivre certes, mais dont les caractéristiques étaient variables et incontrôlables.

Nous allons tout d'abord exposer brièvement le plan de nos recherches et énoncer les principaux résultats obtenus.

1/ Notre travail a consisté en premier lieu en la mise au point d'un appareillage adapté à des mesures faciles, reproductibles, précises des colorations.

2/ Nous avons ensuite cherché à préparer des solutions d' AH_2 et BM possédant à la fois une sensibilité élevée et une stabilité suffisante dans le temps ; nous avons dans ce but étudié l'action des différents facteurs tels

que le pH, la concentration des réactifs, l'influence de la lumière dont les variations affectent la réaction colorée.

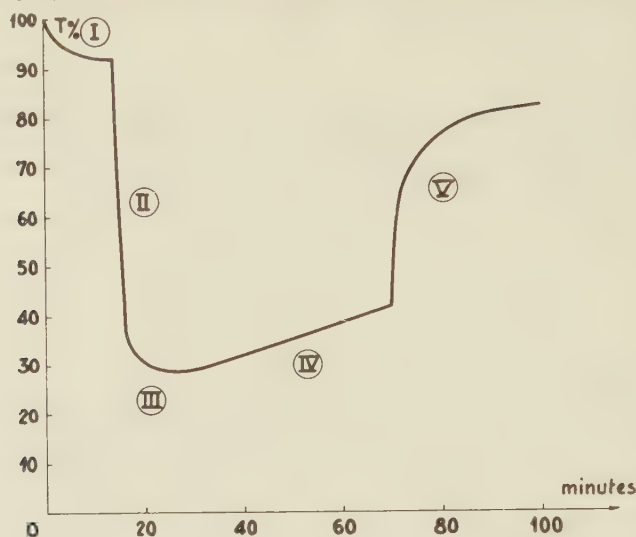


Fig.2 - Variation en fonction du temps de la transmission d'une solution d' AH_2
 1 - aération de la solution ; 2 - addition de cuivre ; 3 - minimum de transmission ; 4 - décoloration spontanée ; 5 - addition de GSH.

Le choix des meilleures conditions expérimentales nous a permis d'aborder l'étude proprement dite de la catalyse au cuivre.

Nous avons mis en évidence :

- que la coloration d'équilibre des solutions aérées est fonction de la concentration en catalyseur. Avec le cuivre, cette réaction colorimétrique, atteignant une sensibilité de $5 \cdot 10^{-4} \mu\text{g}$ de cuivre pour 5 cm^3 , peut être utilisée à un ultramicrodosage de ce métal.

- qu'il existe une relation entre la coloration des solutions et la vitesse avec laquelle elles absorbent l'oxygène (mesures manométriques effectuées par la méthode de WARBURG).

- que l'effet catalytique du cuivre peut être modifié par l'addition de substances capables de le complexer.

La possibilité d'inhibition sélective de ce métal nous a permis d'entreprendre l'étude de l'action catalytique d'autres cations.

3/ Nous avons exposé dans un troisième chapitre les travaux relatifs à l'activité de certains cations métalliques.

Nous avons mis en évidence :

- que seuls le fer et l'argent présentent une activité catalytique, très inférieure cependant à celle du cuivre.

- que la fixation du fer sur le complexe III entraîne une exaltation de l'effet catalytique des ions simples. Ceci nous a permis de doser le fer avec une sensibilité atteignant $5 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/5 \text{ cm}^3$.

- que la présence de fer dans les solutions d' AH_2 additionnées de BM permet l'oxydation de ces solutions aux dépens de peroxydes ajoutés au milieu réactionnel.

- que tant que la coloration des solutions en cours d'oxydation reste faible (transmission lumineuse inférieure à 70 %) la vitesse d'absorption de l'oxygène est sensiblement la même que le catalyseur soit du fer ou du cuivre.

4/ Dans un quatrième chapitre nous avons présenté les travaux relatifs à la formation et à l'accumulation d'eau oxygénée au cours de l'oxydation catalytique de l' AH_2 .

Nous avons montré :

- que les réactions d'oxydation sont accompagnées d'une formation d' H_2O_2 .

- que l'eau oxygénée peut : soit s'accumuler dans le milieu lorsque la catalyse est assurée par le cuivre,

soit être immédiatement utilisée à l'oxydation des solutions en présence de peroxydase ou de doses élevées de fer.

- que la peroxydase n'a aucune activité oxydasique. Sa présence ne modifie pas la vitesse d'absorption de l'oxygène, mais elle accroît fortement la coloration dans le cas de la catalyse par le cuivre, alors qu'elle n'a aucun effet dans le cas de la catalyse par le fer.

5/ Dans un dernier chapitre nous avons étudié les facteurs qui gouvernent la concentration en BM. La concentration instantanée en BM qui nous est accessible par colorimétrie est sous la dépendance de trois réactions : deux génératrices et une destructrice. Une concentration constante en BM indique qu'il y a équilibre entre les vitesses de formation et de réduction du colorant.

a) le BM disparaît sous l'action réductrice de l' AH_2 .

La réduction du BM qui est totale si la concentration du colorant est faible, est une réaction du premier ordre.



Nous avons montré :

- que cette réaction est photosensible.

- que la vitesse de réduction du BM par AH_2 n'est pas influencée par de faibles concentrations de cuivre (inférieures à 1 mg par litre) ni par la présence de fer même à des doses supérieures à 1 gramme par litre.

b) le bleu de méthylène se forme :

- dans l'oxydation de la solution par l'oxygène de l'air.

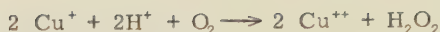
- dans l'oxydation de la solution aux dépens de l' H_2O_2 formée.

Lorsque nous ajoutons des ions cuivriques à la solution de base, ils peuvent être réduits par deux substrats d'oxydation : BMH_2 et AH_2 .



La réaction colorée n'est possible et intéressante que si le leucodérivé du bleu de méthylène est oxydé préférentiellement.

Les ions cuivreux apparus sont réoxydés par l'oxygène de l'air avec formation d'eau oxygénée.



Cette première phase d'oxydation est la phase oxydasique.

Comme nous l'avons mentionné, l'eau oxygénée apparue peut dans certains cas être utilisée à l'oxydation de la solution. C'est la phase peroxydasique.

Nous avons successivement étudié la phase oxydasique, puis la phase peroxydasique dans le cas de la catalyse par le cuivre en présence ou non de peroxydase, puis dans le cas de la catalyse par le fer.

Catalyse par le cuivre : phase oxydasique.

Nous avons cherché à déterminer la proportion d'ions cuivriques, oxydant directement AH_2 , et celle oxydant préférentiellement BMH_2 ; nous verrons que la nature même des phénomènes ne nous a pas permis d'évaluer directement l'importance relative de chacune des deux réactions compétitives.

Cependant, sachant qu'en présence de peroxydase, le pourcentage d' H_2O_2 utilisée à l'oxydation de leucocbleu est supérieur à 90 %, on est amené à admettre, en comparant les concentrations instantanées en BM en présence et en absence de peroxydase (fig. 37), que la participation du système BMH_2/BM dans les réductions des ions Cu^{++} est beaucoup plus importante que celle du système AH_2/A , bien que la concentration du colorant soit très inférieure à celle de la vitamine C.

Catalyse par le fer : En ce qui concerne la phase oxydasique nous avons été amenés à penser que les sels ferriques oxydent préférentiellement AH_2 . L'eau oxygénée formée lors de l'oxydation des ions ferreux par l'oxygène est immédiatement décomposée dès sa formation selon la réaction de FENTON.



HO° oxydant préférentiellement BMH_2

Fe^{+++} oxydant préférentiellement AH_2

Les phénomènes sont différents pour le complexe Fe-EDTA qui se comporte de façon analogue au cuivre dans la phase oxydasique, mais dont l'activité peroxydasique est plus élevée que celle des ions cuivre.

Ce résumé des résultats nous permet dès à présent de représenter schématiquement les mécanismes principaux intervenant au cours de ces réactions d'oxydation.

Le tableau I donne un schéma comparatif des phénomènes se déroulant lors de l'oxydation catalytique d'une solution de vitamine C contenant un peu de BM en présence de cuivre ou de fer. Le schéma proposé permet de rendre compte de la relation liant la concentration en BM à la vitesse de fixation d' O_2 , c'est à dire du rôle du colorant comme couple rédox intermédiaire. Sa participation comme intermédiaire dans la phase oxydasique est élevée quand la catalyse est assurée par les ions cuivre alors qu'elle est faible quand la catalyse est assurée par les ions fer. Par contre dans la phase peroxydasique elle est toujours très forte quel que soit le catalyseur.

Le tableau II représente la suite des réactions intervenant lors des oxydations catalytiques.

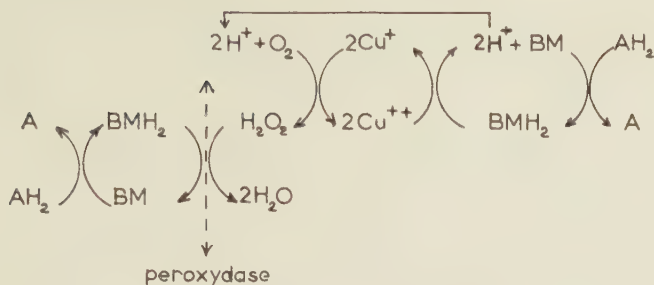
A : en présence d'ions cuivre

B : en présence d'ions cuivre et de peroxydase

C : en présence d'ions fer

(A)

CATALYSE PAR LES IONS CUIVRE



(B)

CATALYSE PAR LES IONS FER

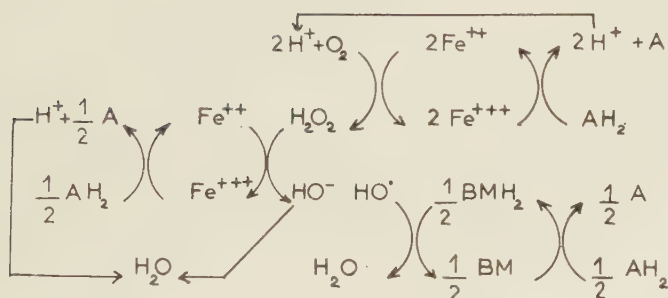


Tableau I : Schéma de l'oxydation catalytique d'une solution d' AH_2 à laquelle a été ajouté un peu de BM

A - Lors de la catalyse par les ions cuivre H_2O_2 tend à s'accumuler elle n'est utilisée à l'oxydation de la solution qu'en présence de peroxydase.

B - Lors de la catalyse par les ions fer H_2O_2 est dès sa formation utilisée à l'oxydation de la solution.

Remarque :

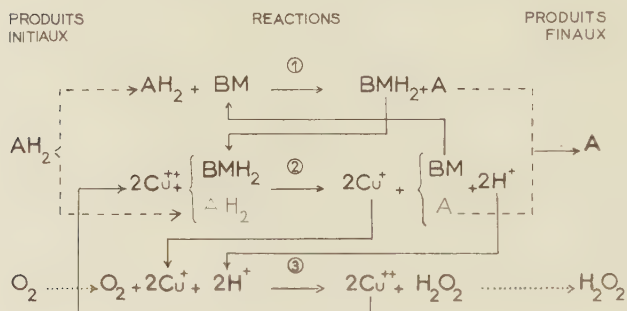
1/. Au cours de l'oxydation des solutions de base, les catalyseurs oscillent constamment entre leur état réduit et leur état oxydé, suivant un cycle de fréquence plus ou moins élevé. La vitesse d'oxydation de la solution dépend de la vitesse de rotation du cycle, donc de la nature du catalyseur, et varie avec sa concentration ; plus celle-ci est élevée, plus l'oxydation se déroule rapidement.

Parmi les réactions successives qui ont lieu dans le processus d'oxydation des solutions étudiées, c'est la réoxydation du catalyseur par l'oxygène atmosphérique qui se produit à la vitesse la plus lente, déterminant la vitesse générale du mécanisme d'oxydation.

Ce fait a été vérifié par BARRON (4) qui, en diminuant la concentra-

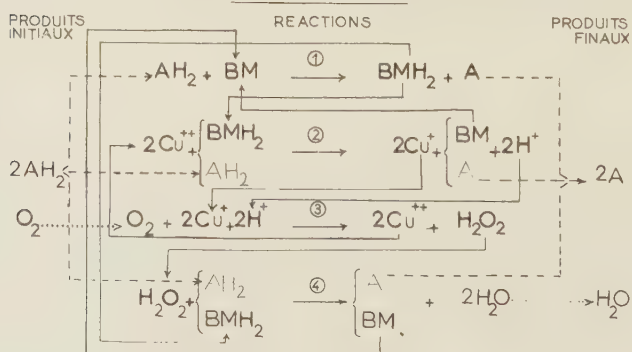
① CATALYSE PAR LES IONS CUIVRE
(SANS PEROXYDASE)

réaction globale principale : $\text{AH}_2 + \text{O}_2 \longrightarrow \text{A} + \text{H}_2\text{O}_2$



② CATALYSE PAR LES IONS CUIVRE
EN PRESENCE DE PEROXYDASE

réaction globale principale : $2 \text{AH}_2 + \text{O}_2 \longrightarrow 2\text{A} + 2\text{H}_2\text{O}$



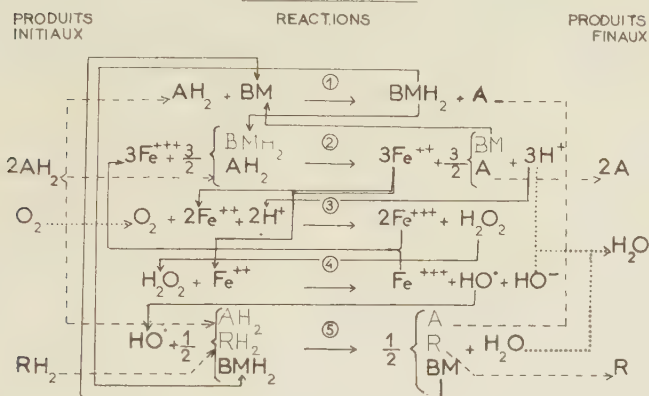


Tableau II : Réactions intervenant lors de l'oxydation catalytique d'une solution d'AH₂ à laquelle a été ajouté un peu de BM.

(En caractères gras les réactions principales)

tion en oxygène dans les fioles de WARBURG de 21 % à 5 %, constatait une inhibition de 56 % sur la vitesse d'oxydation des solutions d'AH₂, avec le cuivre comme catalyseur.

Le cuivre s'avère être un catalyseur d'oxydation plus efficace que le fer car les ions cuivreux sont oxydés presque instantanément par l'oxygène de l'air alors que l'oxydation des ions ferreux s'effectue plus lentement.

2/ Potentiels normaux des systèmes rédox intéressés dans la réaction colorée.

Système	AH ₂ /A	Cu ⁺ /Cu ⁺⁺	Fe ⁺⁺ /Fe ⁺⁺⁺	BMH ₂ /BM
E ₀	+ 0,390	+ 0,167	+ 0,771	+ 0,011
pH	0	0	0	7
t°	25° C	25° C	25° C	-

L'examen des potentiels rédox nous permet de savoir si une réaction est possible et dans quels domaines de concentrations, mais ne donne aucune information sur la vitesse des réactions.

Dans le cas particulier que nous avons étudié, on ne peut accéder à des potentiels d'électrode significatifs pour les raisons suivantes :

1/ Le rapport AH₂/A est très grand, et le système AH₂/A est peu électroactif.

2/ La concentration en cuivre est beaucoup trop faible pour imposer un potentiel défini à l'électrode.

3/ Le rapport BMH_2/BM est très grand à l'équilibre en l'absence d'oxygène.

4/ En cours d'oxydation, le système n'est pas en équilibre, et ce que nous étudions par voie colorimétrique est un système en évolution, aussi, les considérations de potentiels rédox ne sont pour nous que de peu d'intérêt.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE I

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

Nos expériences ont essentiellement consisté en mesures précises de variations de coloration à l'aide d'un colorimètre enregistreur construit au laboratoire, doublées, dans certains cas, de mesures de consommation d'oxygène à l'appareil de WARBURG. Au cours de ce chapitre, nous décrirons le dispositif expérimental utilisé, le mode de préparation et de conservation des solutions de base, et nous insisterons sur le soin apporté aux manipulations

I - MESURES COLORIMETRIQUES

Comme nous l'avons précédemment noté, la sensibilité de la réaction colorée croît lorsque l'intensité lumineuse diminue. Ce fait, lié à l'accroissement de la vitesse de décoloration du BM sous l'influence de la lumière, nous a conduit à effectuer nos mesures sous une très faible intensité lumineuse.

Les colorimètres du commerce se prêtent mal à une telle étude car d'une part, la source lumineuse présente généralement une intensité trop forte et d'autre part, une partie seulement de la cuve de mesure est éclairée, ce qui crée des inégalités de teinte selon les zones d'éclairement de la cuve et donne aux mesures une instabilité indésirable.

Nous avons donc mis au point le dispositif suivant :

Source de lumière : La lumière émise par une lampe à incandescence de 20 watts 6 V traverse un filtre interférentiel (W.S. de la Société Vide Optique Mécanique) établi pour 6.600 angströms, bande passante 150 angströms. Cette transmission correspond à la bande d'absorption des solutions diluées de BM. Nous n'avons pas interposé de condensateur sur le trajet des rayons lumineux.

La lampe est alimentée par un transformateur branché sur tension stabilisée par un stabilisateur Philips 7.776. Le récepteur est une cellule photoélectrique à couche d'arrêt dont la surface utile (18×35 mm) est uniformément éclairée.

Le galvanomètre, un vérispot Sefram utilisé à sa plus grande sensibilité ($1,75 \cdot 10^{-9}$ A/division) a une résistance interne de 680 ohms (période 4 s).

Pour pouvoir suivre dans le temps, les variations de coloration, nous avons associé au galvanomètre un suiveur de spot Photodyne Sefram. Ces enregistrements nous ont non seulement permis d'étudier l'évolution de la

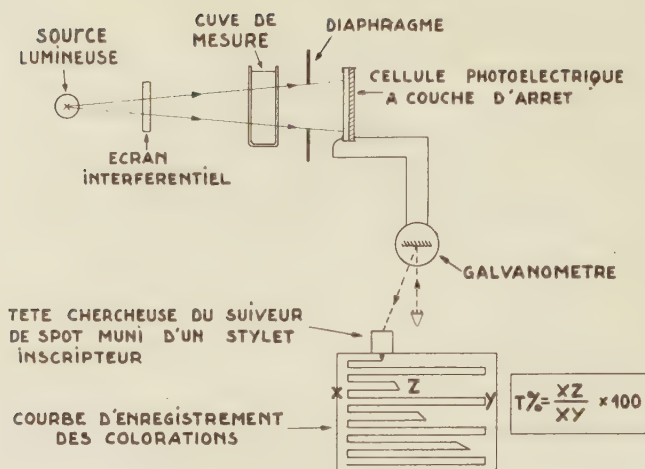


Fig.3 - Schéma du dispositif expérimental.

coloration des solutions, mais de détecter des phénomènes rapides qui auraient échappé à l'observation visuelle. La vitesse normale de déroulement du papier a été fixée à 60 mm/heure ou 60 mm/minuite suivant la rapidité du phénomène observé.

Les cuves de mesure utilisées au début de nos travaux étaient en verre 10 x 20 x 40 mm. Mais l'adsorption non négligeable du BM sur les parois de verre entraîne des erreurs de mesure ; nous avons donc ultérieurement adopté des cuves en quartz. (10 x 17 x 40 mm).

Comme nous l'avons constaté dès nos premiers essais, il est indispensable que de l'air barbote en permanence dans la cuve de mesure afin d'assurer une concentration constante en oxygène. Pendant toute la durée des expériences de l'air fourni par un microcompresseur, purifié par passage à travers différents filtres, arrive par un capillaire dans le fond de la cuve de mesure ; le débit est de 8 à 10 cm³ par minute. Le courant gazeux formé de petites bulles remonte dans un angle de la cuve, il assure à la fois une saturation permanente en oxygène et l'homogénéisation du liquide. Ce barbotage hors du faisceau utile ne perturbe aucunement les mesures colorimétriques.

Pour certaines expériences, il est nécessaire de s'affranchir de l'oxydation catalytique en travaillant sous azote. La solution de base est alors placée dans une cuve en quartz plus haute (10 x 20 x 80) munie pour la circonstance d'un bouchon de plexiglas emboîtant percé de deux trous : l'un laissant passer le capillaire d'arrivée d'azote pur et l'autre permettant l'échap-

pement du gaz et l'introduction des réactifs. L'étanchéité autour du bouchon est assurée par un bourrelet de cire molle.

La cuve est placée à 30 cm environ de la source lumineuse et à 5 cm de la surface sensible de la cellule ; cette dernière distance a été choisie suffisante pour que les gouttelettes de la solution, projetées par l'éclatement des bulles d'air ne viennent souiller la glace protégeant la surface sensible.

Pour obtenir le maximum de précision, nous avons réalisé un dispositif mécanique qui permet de contrôler régulièrement le 100 de transmission et le noir de la cellule.

La cuve est placée sur un chariot d'acier inoxydable soumis à un va et vient. Se présentent alternativement devant le faisceau lumineux :

1/ la cuve contenant la solution à étudier ;

2/ une fenêtre dont la superficie est réglable grâce à un petit cache mobile ; on règle celui-ci pour que la transmission donnée par le faisceau lumineux qui vient frapper la cellule après traversée de la fenêtre, corresponde à la transmission obtenue avec la cuve contenant de l'eau distillée, le dispositif d'aération en marche. C'est le 100 de transmission.

Pendant les déplacements du chariot, un obturateur intercepte le faisceau lumineux ce qui permet de vérifier le zéro de la cellule. Chaque phase dure une minute. La solution en expérience est ainsi soumise à une alternance régulière d'éclairement et d'obscurité.

Ce dispositif s'est révélé d'une parfaite stabilité ; le zéro du galvanomètre est fixe, le 100 de transmission n'est sujet qu'à des variations très faibles et lentes.

La stabilité du dispositif nous autorise pour des expériences d'orientation à laisser en permanence la cuve de mesure devant le faisceau lumineux. Le dispositif précédemment décrit est cependant toujours utilisé pour l'établissement des courbes d'étalonnage.

Les essais sont effectués sur 5 cm³, 8 cm³ ou 10 cm³ de solution de base. Dès la mise en route du barbotage d'air, on assure l'enregistrement des variations de coloration.

En considérant les courbes d'enregistrement (figure 3) :

- soit X la position du spot lorsque le volet protège la cellule des rayons lumineux : transmission zéro.

- soit Y la position du spot lorsqu'entre la source lumineuse et la cellule, est intercalée la cuve de mesure contenant un certain volume d'eau bidistillée dans laquelle barbote de l'air : transmission 100.

- soit Z la position du spot lorsque cette cuve contient le même volume d'une solution dont on désire déterminer la coloration.

Cette coloration sera donnée en transmission par le rapport :

$$T \% = \frac{\text{distance } X Z}{\text{distance } X Y} \times 100$$

Les précisions du dispositif colorimétrique et de nos mesures permettent d'apprécier mieux que le 1 % de transmission.

Il nous a semblé inutile de traduire les colorations en densité optique.

La figure 4 donne les valeurs des transmissions obtenues à l'aide de notre dispositif pour des solutions pures de BM à différentes concentrations.

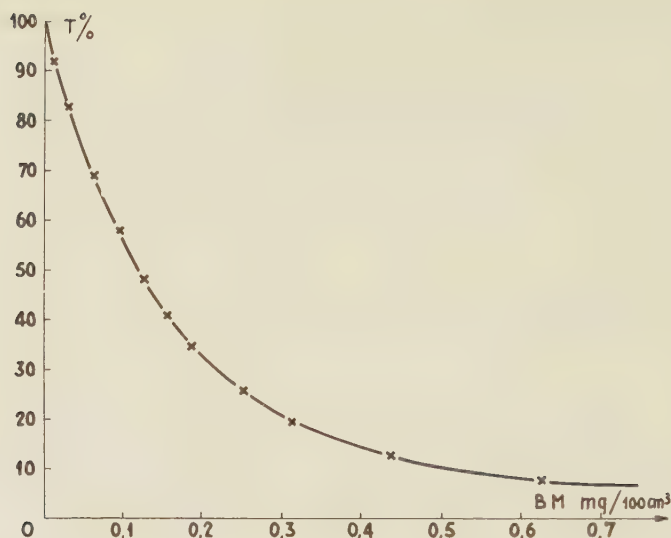


Fig.4 - Transmission en fonction de la concentration en BM d'une solution pure aqueuse.

En se référant à cette courbe 4, il est aisé de traduire les transmissions en concentration de bleu de méthylène.

Nous travaillons à l'obscurité presque totale, dans une salle thermostatée à 25°, ce qui garantit une excellente stabilité du circuit électrique et une mesure précise du volume des réactifs.

II - PREPARATION ET CONSERVATION DES SOLUTIONS

Le mode de préparation, la composition et la conservation des solutions d'AH₂ et BM présentant les meilleures qualités pour l'étude proposée, que nous appelons solutions de base, ont été établies à la suite de différentes observations et tâtonnements. Nous nous limiterons dans ce paragraphe à la description du mode de préparation de solutions particulièrement sensibles, réservant à plus tard l'exposé des motifs qui nous ont guidés vers l'établissement d'une telle technique.

Les solutions de base sont préparées et conservées sous azote et à l'obscurité.

Nous utilisons à cet effet le récipient représenté par la figure 5.

Il porte :

- une burette latérale de 5 cm³ au $\frac{1}{20}$
- un bouchon creux dans lequel on pèse directement le poids voulu d'AH₂ pur.
- un tube central plongeant jusqu'au fond par lequel on fait arriver l'azote.

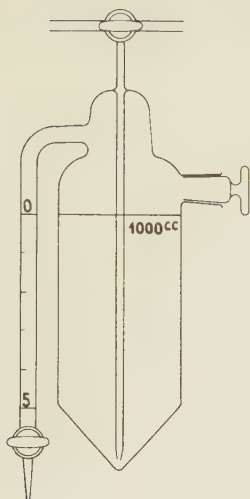


Fig.5 - Récipient utilisé pour la préparation et la conservation des solutions de base.

Le récipient est entièrement enveloppé dans une gaine de tissu noir à usage photographique.

Nous disposons de toute une série de récipients de 100, 500 et 1000 cm³

Pour la préparation de 1000 cm³ de solution de base :

1/ On introduit dans le récipient : 500 cm³ d'une solution de BM dans l'eau bidistillée obtenue par dilution de 25 cm³ d'une solution de BM à 0,1 % préparé 1 mois au moins à l'avance, conservée à l'air et à l'obscurité.

2/ On débarrasse cette solution de l'oxygène dissous par un barbotage prolongé d'azote : 1/2 heure à 1 heure.

3/ On y dissout alors 4,400 grammes d'AH₂ pur pesés directement dans le bouchon rodé. La dissolution de l'AH₂ s'effectue intégralement en moins d'1/4 d'heure.

4/ On verse 500 cm³ d'une solution désaérée de soude préparée à l'aide d'eau bidistillée et contenant exactement 0,500 grammes de soude.

5/ On continue à faire barboter l'azote pendant 1/2 heure. La solution est abandonnée une nuit au repos avant usage. Elle est ensuite conservée sous une pression d'azote de quelques centimètres de mercure.

Au moment d'utiliser la solution on remplit la burette latérale en renversant l'appareil, puis on chasse le volume nécessaire grâce à la pression d'azote. Pour la mesure exacte du liquide on découvre la burette latérale et l'on fait le prélèvement sous une lumière diffuse très faible ; la masse du liquide est ainsi maintenue à l'obscurité.

Seringues micrométriques : Les manipulations de faibles quantités de réactifs se font au moyen d'une seringue en pyrex équipée d'une longue aiguille capillaire en verre, très finement effilée à son extrémité. Le déplace-

ment du piston est obtenu grâce à une butée micrométrique au 1/100 mm. Un cm³ de réactif correspond à un déplacement de 25 mm soit 2.500 divisions.

III - REMARQUES SUR LE SOIN APORTE AUX MANIPULATIONS

Certains auteurs qui se sont préoccupés des mesures de vitesses d'oxydation de solutions d'AH₂, ont mis l'accent sur les précautions extraordinaires qu'il était nécessaire de prendre si l'on voulait obtenir des résultats reproductibles. Des traces infimes d'ions, provenant par exemple du verre des récipients, sont suffisantes d'après KELLIE et ZILVA (66) pour entraîner une accélération continue de la vitesse d'oxydation de l'AH₂. Inversement d'après SCHUMMER (109) des traces imperceptibles de composés sulfurés ou d'oxyde de carbone provoquent l'effet inverse. Cet auteur conseille d'étudier ces réactions dans un local privé de conduites de gaz et où l'on doit s'abstenir de fumer.

Nous nous sommes rapidement aperçus que de tels conseils n'étaient pas inutiles. La sensibilité de notre réaction à la moindre impureté nous a obligés à travailler avec un soin et une propreté extrême, à veiller à la pureté des réactifs et de l'atmosphère des locaux, à la propreté de la vaisselle. Ces précautions étant d'une importance capitale, nous pensons qu'il n'est pas superflu d'insister sur les points suivants :

1/ L'eau utilisée à la préparation des solutions et au lavage de la vaisselle est deux fois redistillée dans un appareil en quartz ou en Pyrex. On conserve cette eau dans des récipients de pyrex très soigneusement nettoyés, utilisés uniquement à cet effet.

2/ Toute la vaisselle est soigneusement nettoyée au mélange sulfochromique et longuement rincée à l'eau bidistillée. Afin d'éliminer les traces de BM adsorbées par les parois, surtout au niveau des angles, après chaque expérience les cuves de mesure sont lavées à l'alcool redistillé, légèrement acidifié par de l'acide chlorhydrique préparé à partir d'eau bidistillée ; après plusieurs rinçages à l'eau bidistillée, les cuves sont gardées pleines d'eau bidistillée à l'abri de poussières. Le capillaire d'arrivée d'air est nettoyé avec le même soin. Au moment de leur utilisation, les cuves sont à nouveau rincées avec de l'eau bidistillée puis à l'obscurité avec quelques cm³ de la solution de base qui doit rester incolore ; s'il n'en est pas ainsi, un second nettoyage s'impose.

3/ Nous avons été amenés à filtrer l'air, qui barbote dans la cuve de mesure, sur ouate imprégnée d'huile, puis à le purifier par passage sur une colonne d'hydroxyde d'argent humide. Les résultats obtenus en prenant ces précautions se sont révélés bien meilleurs : sensibilité au cuivre accrue, diminution de l'affaiblissement de teinte au cours d'une catalyse prolongée.

4/ Le dispositif de purification de l'azote est particulièrement soigné. Il comporte un four à cuivre chauffé à 600°C, puis une série de laveurs remplis de pyrogallate alcalin à 10 % et un flacon témoin contenant une suspension d'hydroxyde manganéux dont le brunissement révélerait un mauvais fonctionnement du dispositif d'épuration.

IV - MESURES MANOMETRIQUES DE CONSOMMATION D'OXYGENE PAR LA METHODE DE WARBURG

La méthode manométrique de WARBURG, universellement utilisée pour l'étude précise des réactions accompagnées d'une variation de volume gazeux, est suffisamment connue pour qu'il soit inutile de la décrire ici. Cependant quelques détails de son application à notre problème méritent d'être décrits.

Les fioles sont débarrassées de la graisse du rôdage par lavage au chloroforme distillé, puis elles sont minutieusement nettoyées à l'acide nitrique fumant chaud, lavées plusieurs fois à l'eau bidistillée, puis rincées à l'obscurité par quelques cm³ de la solution de base qui doit rester incolore (quelques gouttes de solution de base en plus ou en moins n'affectent pas la vitesse de consommation d'oxygène ; seule la quantité de catalyseur a un rôle fondamental).

On dépose alors au fond de la fiole à l'aide d'une seringue micrométrique quelques μg ou fractions de μg de catalyseur. Sous une lumière diffuse très faible on verse dans la fiole 10 cm³ de solution de base. On relie la fiole au manomètre.

Les fioles sont placées dans un bain à 25°C à l'obscurité totale, et agitées 20 minutes avant la fermeture des robinets afin d'atteindre les équilibres de température, de tension de vapeur et de saturation en gaz du liquide.

Les essais sont systématiquement faits en double.

Les lectures manométriques sont effectuées toutes les 10 minutes pendant au moins 1 heure en prenant soin de ne pas éclairer la solution. Les volumes d'oxygène absorbés sont ramenés aux conditions normales.

CHAPITRE II

ÉTUDE DE L'ACTION DU CUIVRE

I - ACTIVITE CATALYTIQUE DU CUIVRE

L'expérience préliminaire présentée dans le chapitre III de la première partie, montre que l'addition de cuivre à une solution d' AH_2 et BM dans l'eau bidistillée, entraîne une coloration d'autant plus intense que la concentration en catalyseur est plus élevée ; cependant dès nos premiers essais, nous avons été frappés par l'irrégularité et la non reproductibilité des mesures colorimétriques.

Les solutions utilisées pour ces premières expériences contenaient alors ; 1,760 g d' AH_2 et 10 mg de BM dans 100 cm^3 d'eau bidistillée ; elles étaient préparées à l'air et à la lumière.

Instruits des observations de KELLIE et ZILVA (66) et de SCHUMMER (109), nous avons manipulé avec grand soin afin d'éviter la contamination des solutions par des catalyseurs ou des inhibiteurs de l'oxydation de l' AH_2 . Cependant, malgré ces précautions, non seulement les augmentations de coloration des solutions après addition d'une même dose de cuivre variaient considérablement, mais les courbes de transmission en fonction du temps avaient des allures très différentes.

La figure 6 donne quelques types de courbes obtenues après addition de 0,5 μg de cuivre à 8 cm^3 de solution d' AH_2 et BM.

L'augmentation de coloration après addition de cuivre était généralement rapide (A.B.) parfois lente (C). La valeur du minimum de transmission variait considérablement, il était toujours suivi d'une décoloration plus ou moins rapide (A.B.). Certaines solutions se révélaient très peu sensibles à l'addition du cuivre (D). (Fig. 6).

Notre premier travail fut d'essayer d'obtenir des résultats reproductibles et cohérents ; nous avons pour cela recherché les causes des variations de la sensibilité au cuivre des solutions d' AH_2 et BM.

A - STABILITE DES SOLUTIONS

1/ Conservation sous azote

Nous avons rapidement établi que les anomalies observées avaient pour origine une altération des solutions dans le temps. En effet, quelles que

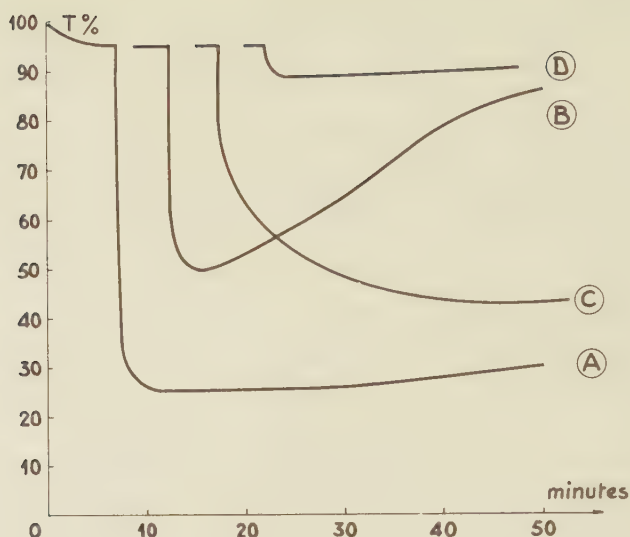


Fig.6 - Différents types de courbes obtenues lors de l'étude des variations de transmission au cours du temps de solutions d' AH_2 + BM préparées de façon identique et additionnées d'une même dose de Cu : $0,1 \mu\text{g}/8 \text{ cm}^3$.

soient les précautions prises pour la pureté de l'eau bidistillée et la propriété des récipients, on ne peut éviter complètement l'oxydation de l' AH_2 . Autoxydation ou présence d'impuretés à action catalytique, on retrouve constamment ces raisons dans la littérature qui traite du sujet, sans pouvoir trancher définitivement entre elles.

Pour éviter cette altération, la solution de base a été préparée et conservée sous azote pur. Par titrage périodique au dichlorophénolindophénol on a pu vérifier que la solution conservait un titre invariable pendant des mois.

2/ Conservation à l'obscurité

Bien que le titre ait été invariable, les solutions n'étaient pas stables, leur sensibilité au cuivre diminuait peu à peu au cours du vieillissement.

Les observations suivantes nous ont permis d'établir que la lumière était responsable de ce phénomène.

- Si la solution de base est conservée sous azote et à l'obscurité, sa sensibilité au cuivre reste pratiquement constante.

- Si la solution de base conservée sous azote est soumise à une insolation assez intense (lumière solaire ou lampe à incandescence), elle perd rapidement sa sensibilité. Mais si la solution est aérée pendant l'insolation il ne se produit aucun changement appréciable de ses propriétés. Nous étudierons ultérieurement avec plus de précision l'action de la lumière sur les solutions de base (ce même chapitre parag. III. E.) qui entraîne la formation de substances capables d'engager le cuivre dans des complexes dépourvus d'activité catalytique.

Des solutions préparées sous azote et à l'obscurité ont enfin permis, d'obtenir des résultats plus cohérents. A l'addition du cuivre, la solution se colore rapidement, la transmission se fixe quelques minutes à une valeur qui dépend de la concentration en catalyseur puis le contenu de la cuve s'éclaircit lentement (courbe du type A de la figure 6). Il est alors possible de tracer des courbes représentant les valeurs de ces minima de transmission en fonction des doses croissantes de cuivre présent.

3/ Vieillessement des solutions

La reproductibilité des résultats n'était cependant pas encore satisfaisante. En traçant à quelques jours d'intervalle les courbes de sensibilité au cuivre d'une même solution conservée toujours sous azote et à l'obscurité, nous nous sommes aperçus qu'il se produisait au cours du temps une lente augmentation de la sensibilité de la solution aux ions cuivre.

La figure 7 donne un exemple de l'effet du vieillissement. On remarque en particulier que la courbe qui présentait à l'origine une nette forme sigmoïde évolue, et l'S disparaît peu à peu.

Après une quinzaine de jours on obtenait une solution, douée d'une sensibilité au cuivre qui demeurait à peu près constante dans le temps. La pente de la courbe d'étalonnage était alors maximum à l'origine et simultanément nous constatons que l'affaiblissement de la teinte, consécutif au minimum de transmission, devenait moins accusé.

Nous avons remarqué qu'une aération de courte durée de la solution était un facteur favorable à cette évolution bien que la préparation à l'air n'ait jamais donné de solutions douées d'une sensibilité très élevée.

Nous avons ultérieurement mis en évidence que cette évolution était due à la disparition lente de substances inhibitrices apportées essentiellement par le BM. Nous avons par la suite, préparé des solutions de base douées d'une sensibilité au cuivre maxima dès leur fabrication, en utilisant à cet effet, une solution de BM préalablement vieillie à l'air et à l'obscurité.

Possédant enfin des solutions stables permettant l'obtention de résultats reproductibles, nous avons pu aborder l'étude de leur oxydation catalytique. Afin d'étudier ces réactions dans toute leur finesse, nos recherches ont d'abord été orientées vers la mise au point de solutions présentant le maximum de sensibilité aux catalyseurs d'oxydation.

B - SENSIBILITE DES SOLUTIONS

Nous avons étudié l'incidence de la concentration des réactifs et du pH sur la réaction colorée. Les solutions d' AH_2 et de BM se révélaient si sensibles aux catalyseurs d'oxydation et aux inhibiteurs que nous avons été amenés à rechercher les réactifs présentant le maximum de pureté.

1/ Influence de la concentration en AH_2

L' AH_2 doit être en excès afin que les variations de sa concentration pendant la durée des expériences d'oxydation soient pratiquement négligeables, donc que la concentration puisse être considérée comme constante au cours des différents essais.

Expériences : Pour étudier l'influence de la concentration en AH_2 sur la sensibilité de la réaction au cuivre, nous avons préparé des dilutions successives d'une solution mère d' AH_2 ; nous leur avons ajouté un même volume

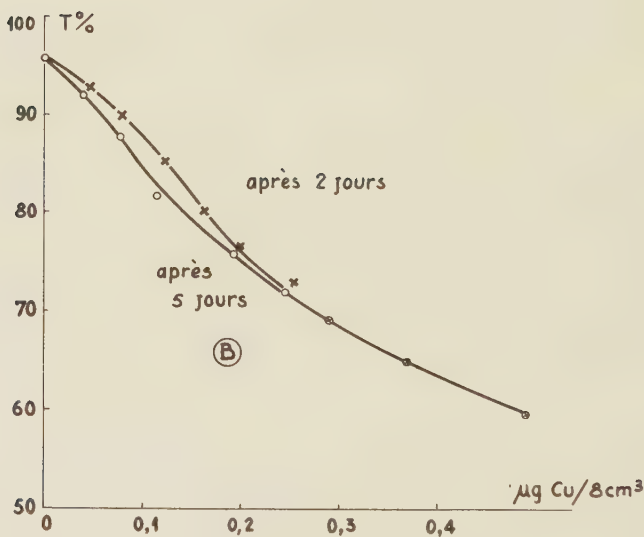
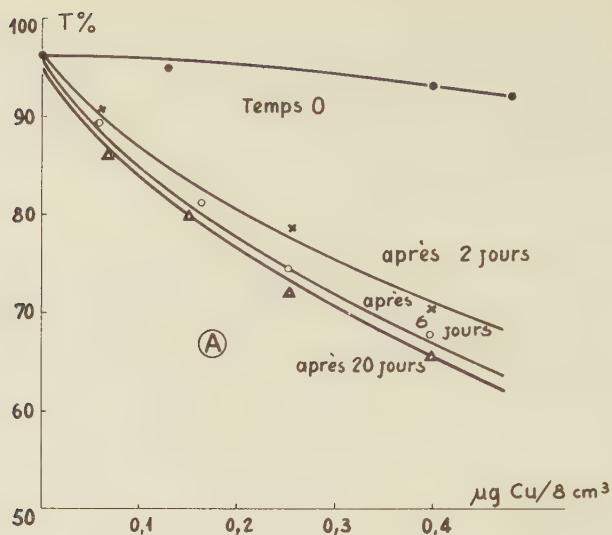


Fig.7 - Deux exemples d'augmentation de sensibilité au cuivre de solution de base en cours de vieillissement.

d'une solution de BM préalablement vieillie ($0,1 \text{ cm}^3$ de solution de BM à 1 g/litre).

Pour chaque dilution, nous avons mesuré la transmission d'équilibre stable en l'absence de catalyseur, puis après addition d'une même quantité de cuivre ($0,2 \mu\text{g}$ dans 8 cm^3 .)

Les valeurs des minima obtenus sont consignées dans le tableau III, elles ont permis de tracer les courbes A et B de la figure 8.

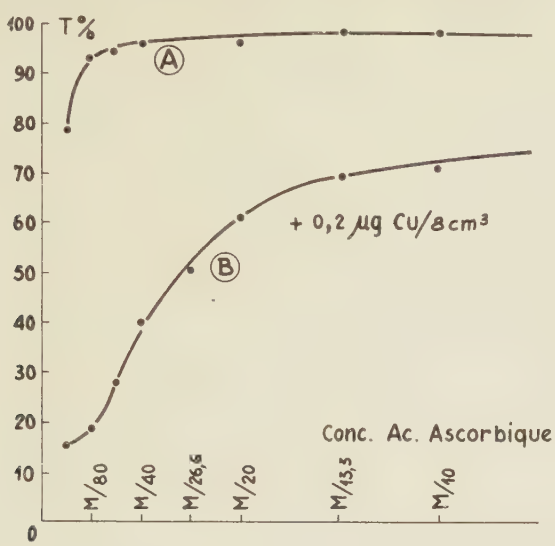


Fig.8 - Influence de la concentration en AH₂ sur la coloration d'équilibre de solutions de base : A - sans cuivre ; B - additionnées de 0,2 µ g de cuivre pour 8 cm³.

Tableau III
Influence de la concentration en AH₂ sur la sensibilité au cuivre des solutions de base.

Concentration en AH ₂	Transmission % sans cuivre	Transmission % 0,2 µgCu/8 cm ³	Ecart % Transmission
M/160	77	15	62
M/80	92,5	18	74,5
M/53	94	27,5	66,5
M/40	95,5	40	55,5
M/26,6	96	50	46
M/20	96	61	35
M/13,3	97	70	27
M/10	97	71	26
M/ 5,3	94,2	79	15,2
M/ 2	94	87,5	6,5

Conclusion : On constate une augmentation de la sensibilité quand la concentration en AH₂ diminue jusqu'à M/80.

Au-delà de cette dilution la transmission en l'absence de cuivre baisse proportionnellement plus qu'en sa présence, il n'est donc pas intéressant de poursuivre la dilution.

Les courbes de la figure 9, établies pour deux concentrations différentes (A : M/10 et B : M/160), montrent l'influence de la dilution de l'AH₂ sur la sensibilité à des doses variables de cuivre. On remarquera en particulier la forme en S prononcée de la courbe B.

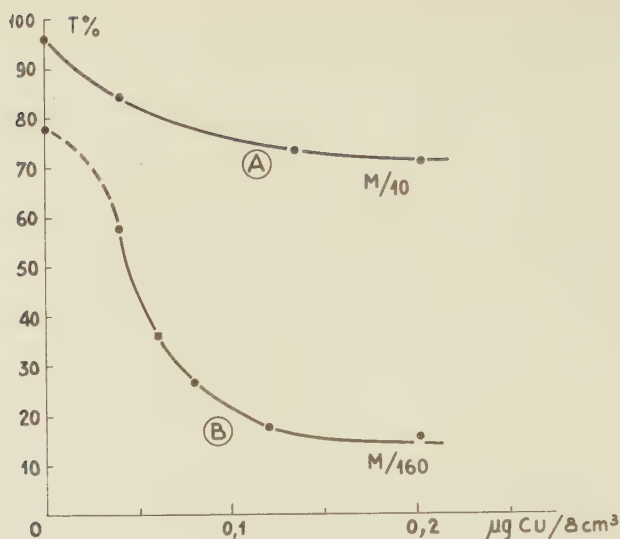


Fig. 9 - Sensibilité au cuivre pour deux concentrations différentes d' AH_2 :
 A - AH_2 M/10 ; B - AH_2 M/160.

2/ Influence de la concentration en BM

La concentration en BM doit, d'une part être assez faible afin que le colorant puisse être totalement réduit par l' AH_2 et que la solution de base soit ainsi incolore, d'autre part suffisante pour que la transmission d'une solution dans laquelle le BM se trouverait intégralement à l'état oxydé puisse tomber aux environs de 10 %.

Expériences : Nous avons utilisé une solution d' AH_2 $\frac{M}{5}$ à laquelle nous avons ajouté des volumes croissants d'une solution vieillie de BM à 1 g/litre, puis complétée avec de l'eau pour avoir en définitive une solution $\frac{M}{10}$.

Pour chaque essai, nous avons attendu que la décoloration soit maximum en l'absence de cuivre, puis nous avons ajouté au contenu de la cuve 0,2 μg de cuivre. Pour chaque concentration en BM on obtient ainsi un point représentant la transmission de la solution, avant (courbe A) et après addition de cuivre (courbe B).

Les résultats rassemblés dans le tableau IV ont permis de tracer les courbes A et B de la figure 10.

Il est curieux de constater, que la courbe A présente un minimum de transmission pour une concentration en BM de l'ordre de 0,3 mg dans 8 cm³ de solution. La courbe B remonte également, mais pour des doses beaucoup plus importantes en BM (1,5 mg dans 8 cm³). Ces particularités sont dues aux inhibiteurs apportés par la solution de BM. Nous étudierons cette question en détail au cours du paragraphe consacré à l'inhibition de la catalyse au cuivre.

Conclusion : Il est intéressant de noter qu'entre d'assez larges limites, la sensibilité au cuivre demeure sensiblement inchangée quand la concentration en BM varie.

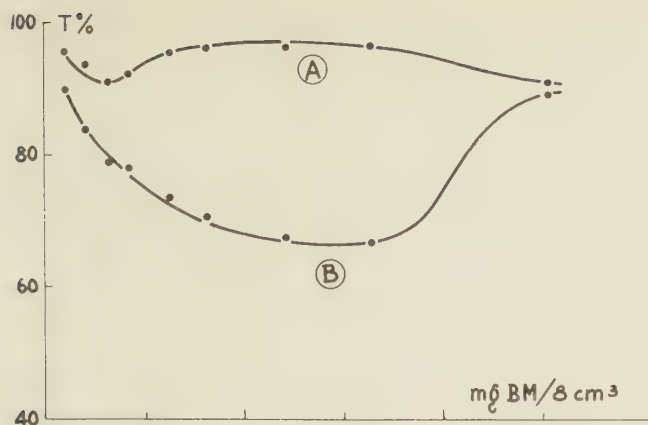


Fig.10 - Influence de la concentration en BM sur la coloration d'équilibre de solutions de base : A - sans cuivre ; B - additionnées de $0,2 \mu\text{g}$ de cuivre pour 8 cm^3 .

Tableau IV

Influence de la concentration en BM sur la sensibilité au cuivre des solutions de base.

cm^3 BM ajoutés dans 8 cm^3	Transmission % sans cuivre	Transmission % $0,2 \mu\text{g Cu}/8 \text{ cm}^3$	Ecart % transmission
0,1	95,2	89,7	5,5
0,2	93,3	84	9,3
0,3	91,3	79,5	11,8
0,4	92,4	78	14,4
0,6	95,9	74,3	21,6
0,8	97	70,8	26,2
1,2	96,5	67,7	28,8
1,6	96,2	67,4	28,8
2,5	91,5	90	1,5
5	83	82,5	0,5

Remarque : Les schémas proposés pour l'interprétation des phénomènes (tableaux I et II) cadrent avec les observations faites au cours de l'étude de l'influence de la variation des concentrations en AH_2 et en BM sur la sensibilité de la réaction colorée. En effet, en considérant ces schémas, nous constatons que la vitesse instantanée de la décoloration du BM sera d'autant moins rapide que la concentration en AH_2 sera plus faible. On peut prévoir un accroissement du pourcentage de catalyseur oxydant le bleu de méthylène pour une diminution de la concentration en AH_2 ou une augmentation de la concentration en BM.

3/ Influence du pH

Il est bien connu que l'augmentation du pH se traduit par un accroissement de la vitesse d'oxydation des solutions d' AH_2 (4) (134) (94) (101) (41) (18). Si la vitesse d'oxydation et la coloration d'équilibre des solutions d' AH_2 et BM sont liées, on devrait s'attendre à ce que l'augmentation du pH se tra-

duise par une accentuation de la teinte d'équilibre pour une même concentration en ions cuivre.

Remarquons que la simple dilution d'une solution d' AH_2 s'accompagne d'un accroissement du pH.

Expériences : Afin d'éviter des perturbations éventuelles provoquées par les constituants des solutions tampons, nous avons modifié le pH d'une solution $\frac{M}{10}$ d' AH_2 , par addition de petits volumes d'acide chlorhydrique N préparé à partir d'eau bidistillée, ou de soude pure MERCK N préparée avec le même soin immédiatement avant l'essai ; le pH était mesuré à l'électrode de verre dans un essai parallèle.

Pour un certain nombre de valeurs de pH on mesurait la transmission en l'absence de cuivre, puis après addition d'une quantité donnée de cuivre. Les résultats sont illustrés par les courbes A et B de la figure 11.

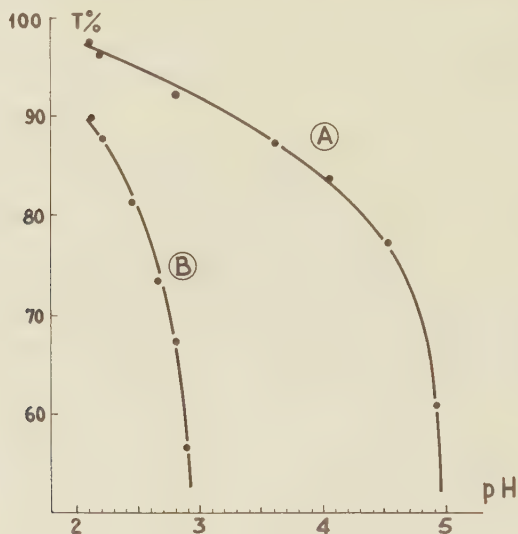


Fig. 11 - Influence du pH sur la coloration d'équilibre : A - sans cuivre : B - 1 μg de cuivre pour 8 cm^3 .

On constate que la teinte d'équilibre de la solution exempte de cuivre ne s'accroît que légèrement quand le pH croît (A) tandis qu'en présence de cuivre l'augmentation est considérable (B).

Conclusions : On déduit de ces expériences que si l'on veut accroître la sensibilité de la réaction aux ions cuivre on a intérêt à utiliser un mélange acide ascorbique/ascorbate de soude de pH assez élevé. Il ne faut cependant pas que la solution de base présente une absorption trop importante.

Cette remarque jointe au fait que la solution équimoléculaire en AH_2 , et en son sel de sodium (pH = 4,1) présente l'indice tampon maximum, nous l'a fait adopter.

Si l'on passe à des pH plus élevés, et à plus forte raison au-delà de pH = 7, les phénomènes sortent du cadre que nous nous sommes imposé. En effet la vitesse d'oxydation (oxydation catalytique et autoxydation) devient si

rapide, que l'oxygène dissous se trouve absorbé en quelques secondes, et la solution se décolore ; la vitesse de dissolution d'oxygène lors du barbotage devient dans ce cas le facteur limitatif de la réaction.

4/ Choix des réactifs

Avant toute addition de catalyseur et dès le début de l'aération, la solution de base présente une baisse de transmission qui passe de 100 % à 94-96 % en une douzaine de minutes, puis se stabilise à cette valeur pendant plusieurs heures. On est tenté d'en attribuer la cause à la présence de traces de cuivre existant dans les réactifs. Ces derniers contiennent également un certain nombre d'impuretés capables de complexer le cuivre jouant ainsi le rôle d'inhibiteurs de son action catalytique.

L'étude du choix des réactifs a été entreprise afin de déterminer l' AH_2 et le BM contenant les plus faibles traces de cuivre et le moins possible d'inhibiteurs.

a) Acide ascorbique : Une série de solutions a été préparée dans les conditions exposées (parag. II du chapitre I) en utilisant des produits de 5 origines différentes.

Solution Q : MERCK (acide ascorbique tout pur cristallisé)
Solution R : FLUKA (vitamine C purum, (+) Ascorbinsäure)
Solution S' : HOFFMANN LA ROCHE (acide (+) ascorbique)
Solution T : BDH (ascorbic acid-vitamine C)
Solution U : Rhône Poulenc (acide ascorbique vitamine C Codex)
Solution V : HOFFMANN LA ROCHE (acide d (-) iso-ascorbique)

Toutes ces liqueurs sont très stables dans le temps. Dans tous les cas le barbotage d'air fait baisser la transmission aux environs de 95 %.

Nous avons étudié la stabilité et la sensibilité de ces solutions après addition de $1/25 \mu g$ de cuivre dans $8 cm^3$.

Les courbes donnant les variations de la transmission en fonction du temps sont tracées figure 12.

Elles montrent que la solution T malgré une sensibilité au cuivre légèrement inférieure à celles des solutions Q - R - S' présente la stabilité maximum, la transmission conservant une valeur stable pendant presque une heure.

L'acide ascorbique BDH a donc été utilisé à la préparation d'un certain nombre de solutions. Ultérieurement nous avons adopté l'acide ascorbique spécialement recristallisé à notre intention par les laboratoires HOFFMANN LA ROCHE, car les solutions S ainsi préparées, se sont révélées d'une meilleure stabilité et d'une sensibilité accrue.

b) Bleu de méthylène : Nous avons soumis aux essais, du BM de trois origines différentes :

1/ MERCK : Bleu de méthylène B extra
2/ B.D.H. : Méthylène Blue Standard Stain
3/ R.A.L. : Bleu de méthylène base pour bactériologie.

Ce dernier a été éliminé en raison de la présence de matières insolubles.

Les solutions à 1 g par litre préparées dans l'eau bidistillée à partir des produits 1 et 2, contiennent toutes deux au moment de leur préparation une teneur non négligeable en inhibiteurs (plus élevée pour 2 que pour 1), mais après plusieurs semaines de vieillissement elles donnent :

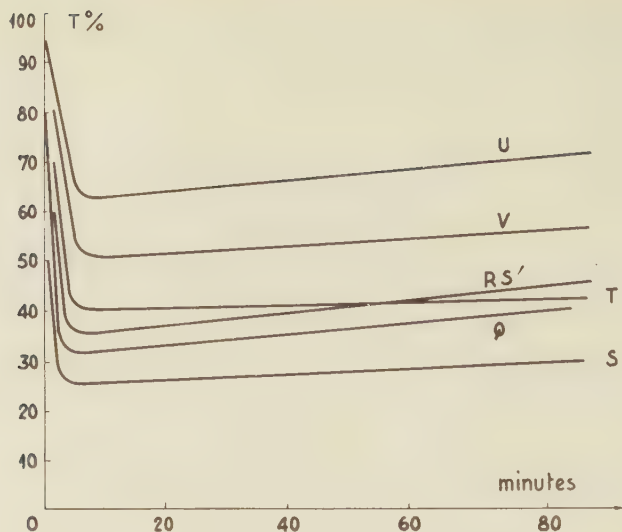


Fig.12 - Variation de la transmission en fonction du temps donnée par différentes solutions de base après addition de $0,04 \mu\text{g}$ de cuivre pour 8 cm^3 .

- la même valeur de transmission par aération.

- la même courbe de sensibilité au cuivre lorsqu'elles sont utilisées avec un même échantillon d' AH_2 .

Pureté du BM

Afin de déterminer la pureté des colorants utilisés, nous avons dosé le BM par la méthode de F.A. MAURINA et N. DEAHL (84).

Le BM est précipité par du perchlorate de potassium.

Dans 100 cm^3 de solution de BM à 1 % on verse 30 cm^3 d'une solution renfermant 0,5 g de perchlorate de potassium dans l'eau bidistillée.

On laisse en contact 10 minutes en agitant de temps en temps, le colorant précipite sous forme de perchlorate violet ; on filtre sur creuset de Gooch taré, on sèche 1 heure à 110°C .

La méthode nous indique qu'en multipliant le poids du précipité par le coefficient 0,8333 on obtient le poids du BM pur anhydre.

Nous avons ainsi pu déterminer que la pureté du BM MERCK est de 76 % et du BM B.D.H. 87,5 %.

C - MICRODOSAGE DU CUIVRE EN SOLUTION MINERALE NE CONTENANT QUE CET ION

1/ Courbe d'étalonnage du cuivre

Les précédentes recherches sur la stabilité et la sensibilité au cuivre des solutions d' AH_2 contenant du BM, nous ont permis de mettre au point un

mode de préparation de solutions particulièrement sensibles, technique que nous avons exposée en détail au parag. II du chapitre I.

Rappelons brièvement que cette solution est :

$\frac{M}{40}$ en acide ascorbique, à moitié neutralisé par de la soude.

M/12 000 en bleu de méthylène.

Nous avons appelé T les solutions de base préparées avec de l'AH₂ BDH et S les solutions de base préparées avec de l'AH₂ HOFFMANN LA ROCHE.

Ces solutions de pH, 4,1 sont préparées sous azote et à l'obscurité.

Pour la mesure, 5 cm³ de solution de base sont versés dans la cuve colorimétrique. Le barbotage d'air étant assuré, on enregistre l'évolution de la coloration. La liqueur, préalablement incolore, bleuit légèrement par aération ; en 5 à 10 minutes, la transmission se fixe au voisinage de 95 %. S'il n'en était pas ainsi, la solution serait jugée polluée et l'essai serait à reprendre.

Le palier de coloration de départ étant stable, on introduit à l'aide de la seringue micrométrique une dose connue de cuivre. La transmission diminue et atteint une valeur minimum en 5 à 10 minutes. La relation existant entre ce minimum de transmission et les quantités de cuivre introduites, a permis de tracer la courbe A de la figure 13.

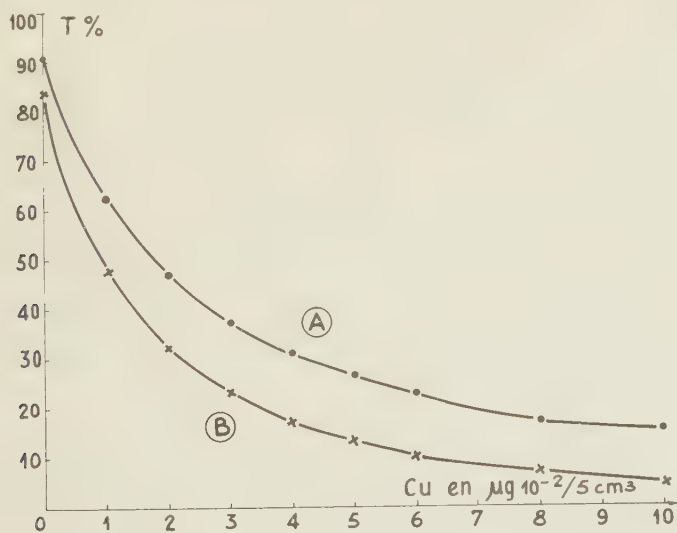


Fig. 13 - Courbe de sensibilité au cuivre d'une solution S :
A - sans peroxydase ; B - 10 μg de peroxydase/5 cm³.

La courbe B est obtenue en présence de peroxydase, nous reviendrons sur ce point au cours du 4ème chapitre.

Les solutions de base additionnées de cuivre se décolorent lentement au cours de la catalyse, nous sommes obligés d'utiliser une solution fraîche pour la détermination de chaque point de la courbe d'étalonnage.

Nous constatons qu'une baisse de transmission de 1 % à l'origine correspond à $3,5 \cdot 10^{-4} \mu\text{g}$ de cuivre dans 5 cm^3 de solution.

Cette réaction colorée, extraordinairement sensible, peut être appliquée, dans les conditions décrites pour le tracé de la courbe d'étalonnage à un ultra-microdosage du cuivre particulièrement précis, lorsque le métal se trouve en solution minérale ne contenant que cet ion.

Nous étudierons l'influence que peuvent avoir sur ce dosage la présence dans la solution à analyser :

- d'autres cations (chapitre IV - parag. III)
- de substances capables de complexer le cuivre (ce chapitre, parag. III).

2/ Précision de la méthode de microdosage du cuivre

Cette précision peut être limitée :

- Par les erreurs commises sur les mesures de longueur effectuées sur les graphiques d'enregistrement, ou les déterminations de volumes des réactifs utilisés.

- Par l'erreur due à une éventuelle dérive du dispositif de mesure colorimétrique.

- Par la non reproductibilité de l'oxydation des solutions de base sous l'effet des traces de cuivre, attribuable à la présence d'impuretés à action catalytique ou inhibitrice.

Considérons ces différents points :

a) Les erreurs faites sur les mesures de longueur peuvent être considérées comme négligeables puisque l'on peut obtenir une précision de l'ordre de $1/400$.

Les faibles quantités de cuivre ajoutées aux solutions de base doivent être déterminées avec précision. Nous utilisons une solution de sulfate de cuivre MERCK (légèrement acidifiée par addition d'une goutte d'acide sulfurique pur par litre de solution) à $10 \mu\text{g}$ de cuivre par cm^3 . Les seringues micrométriques décrites précédemment (chapitre I, parag. II) permettent de mesurer le $1/2500 \text{ cm}^3$ soit $0,0048 \mu\text{g}$ de cuivre ; pouvant aisément apprécier la demi-division, nous atteignons une précision de $0,0024 \mu\text{g}$ sur le cuivre.

Pour mesurer avec plus de précision les plus faibles quantités de catalyseur utilisées, nous nous sommes servis d'une solution de sulfate de cuivre à $1 \mu\text{g}$ de cuivre par cm^3 , ce qui nous a permis d'apprécier $0,0002 \mu\text{g}$ de cuivre. Mais nous nous sommes aperçus que l'activité d'une solution ainsi diluée avait tendance à baisser quand elle était conservée dans la seringue micrométrique. Cependant, on obtient d'excellents résultats en rechargeant la seringue avec une solution fraîche avant chaque mesure. Nous pensons qu'à une telle dilution ce phénomène est dû à l'adsorption des ions par les parois de la seringue et surtout de l'aiguille capillaire où le rapport surface/volume est grand.

b) La reproductibilité des mesures données par le dispositif colorimétrique s'est avérée très bonne.

L'erreur commise sur la coloration d'une solution étalonnée de BM est en effet inférieure à 0,3 % pour les colorations les plus faibles.

c) La troisième cause d'erreur est la plus importante.

Les solutions préparées dans des conditions identiques à partir de produits pris dans les mêmes flacons n'ont pas toujours rigoureusement les mêmes caractéristiques. On doit tracer pour chaque solution de base une courbe d'étalonnage.

Dans la suite de nos recherches, nous avons travaillé sur des solutions qui donnaient des résultats très reproductibles (précision relative de l'ordre de 1 %). Mais il n'en a pas été ainsi au début. Les résultats rapportés dans la première colonne du tableau VI le montrent : la précision relative y était de l'ordre de 5 %.

3/ Relation entre la concentration en BM et la concentration en cuivre : coefficient d'amplification des effets du cuivre

Il est intéressant pour une solution donnée de relier la concentration en cuivre à la teneur en BM apparue. La courbe 14 traduit cette relation. Elle est obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de la solution étudiée, et de celle qui exprime la transmission de solutions aqueuses de BM de concentration connue (figure 4).

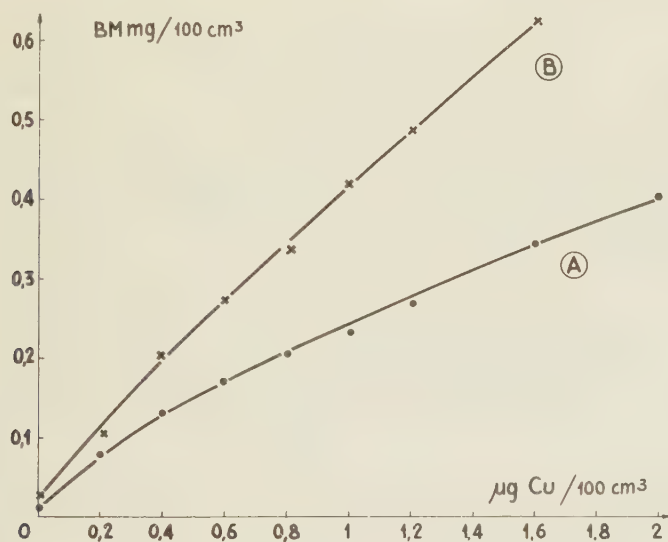


Fig.14 - Relation entre la concentration en BM et la concentration en cuivre qui lui donne naissance :

A - sans peroxydase ; B - 10 µg de peroxydase/5 cm³.

L'allure de ces courbes, très voisine d'une droite, met en évidence la proportionnalité existant entre la quantité de catalyseur et la concentration en BM à l'équilibre. On remarque que l'augmentation de couleur consécutive à l'addition de traces de cuivre correspond à une concentration en BM très supérieure à la concentration en cuivre.

Cette amplification est à l'origine de l'extrême sensibilité de la réaction, et par conséquent de celle de notre microdosage.

Le rapport entre la concentration en BM à l'équilibre et celle qui résulterait de l'oxydation d'une quantité de leucobleu correspondant stœchiométriquement

quement au cuivre ajouté nous permet de déterminer le "coefficient d'amplification" du système.

La courbe d'étalonnage A de la figure 13 nous montre que 0,0012 μg de cuivre font passer la transmission de 84 % à 80 %. D'autre part, la figure 4 nous indique que pour obtenir le même résultat entre les mêmes limites de transmission, la concentration en BM doit augmenter de 0,468 μg de BM pour 5 cm^3 .

Or si le cuivre introduit à l'état cuivrique ne libérait que la quantité stoechiométrique de BM selon la réaction :



la quantité de BM mise en liberté par 0,0012 μg de cuivre aurait été de 0,00279 μg de BM.

La concentration du BM à l'équilibre dans les conditions de très faible éclaircissement de nos essais, se trouve ainsi multipliée par un facteur voisin de 175, qui en présence de peroxydase s'élève à 260. Ce coefficient donne une idée de la vitesse avec laquelle le cuivre oscille entre les formes Cu^+ et Cu^{++} sous l'influence de l'acide ascorbique du leucobleu de méthylène et de l'oxygène de l'air.

D - L'ACIDE ASCORBIQUE OXYDASE

Ainsi que nous l'avons mentionné au cours de l'introduction de ce travail, c'est en 1935 que TAUBER, KLEINER et MISHKIND (122) isolèrent du péricarpe de courge une enzyme : l'acide ascorbique oxydase capable de catalyser l'oxydation de l' AH_2 .

Etant donné la forte activité catalytique des ions Cu^{++} sur l'oxydation de l' AH_2 certains auteurs ont douté de l'existence de l'acide ascorbique oxydase (73) (87). LAMPITT et CLAYSON (72) ont pensé que l'activation catalytique observée dans les systèmes naturels pouvait être attribuée au cuivre ionique formé par la dissociation de l'enzyme qui est un complexe protéique du cuivre.

DAWSON et ses collaborateurs (19) (20) restent d'ardents défenseurs de l'acide ascorbique oxydase. Ils font reposer la preuve de son existence sur les faits suivants :

1/ La spécificité de cet enzyme limitée à certaines molécules renfermant la fonction éné-diol dont l'acide ascorbique, l'acide d- araboascorbique, la glucoréductone, l'acide réductinique.

2/ L'acide l - ascorbique est plus rapidement oxydé par l'acide ascorbique oxydase que l'acide d- ascorbique.

3/ Le mécanisme d'oxydation de l' AH_2 par les ions cuivre et par l'acide ascorbique oxydase est différent. Il n'y a pas accumulation d'eau oxygénée au cours de l'oxydation enzymatique, tandis que dans la catalyse au cuivre la quantité d'oxygène consommé est plus élevée à cause de la formation et l'accumulation simultanée d'eau oxygénée.

4/ Des expériences récentes d'électrophorèse et d'ultracentrifugation conduisent à affirmer l'existence d'un enzyme Cu/protéine dont la masse moléculaire est de 150 000 et qui contient 0,26 % de cuivre (26).

5/ Des préparations fraîches de cet enzyme ont une activité catalytique plusieurs fois supérieure à celle des ions cuivre libres, en quantité correspondante.

6/ Certains inhibiteurs de l'action du cuivre sont sans action sur l'acide ascorbique oxydase.

Nous avons pensé pouvoir appliquer avec succès notre technique à l'étude comparée de l'activité catalytique de l'acide ascorbique oxydase et du cuivre libre.

Nous avons donc entrepris la préparation d'acide ascorbique oxydase à partir d'écorce de potiron selon la méthode de T. EBIHARA ⁽²⁷⁾. La préparation enzymatique recueillie, ajoutée à la solution de base colorait fortement cette solution, ce qui traduisait une action catalytique élevée sur l'oxydation de l'AH₂. Mais une décoloration rapide de l'essai semblait correspondre au manque de stabilité de cet enzyme signalé par les différents auteurs cités plus haut.

Nous n'avons pas poursuivi ce travail qui nécessitait des préparations très longues pour lesquelles nous n'étions pas équipés.

II - VITESSE D'OXYDATION DES SOLUTIONS ADDITIONNEES DE CUIVRE

Les essais d'orientation entrepris au début de notre travail nous ont permis de constater que les colorations des solutions d'AH₂ contenant du BM additionnées de cuivre, et leur vitesse de consommation d'oxygène mesurées par la méthode manométrique de WARBURG, étaient étroitement liées. Cependant lorsque nous avons voulu préciser le phénomène, nous nous sommes heurtés à certaines difficultés.

Dans les conditions de nos expériences (10 cm³ de solution par fiole de WARBURG) les quantités d'oxygène absorbé sont faibles, ce qui nécessite des mesures prolongées pendant au moins 1 heure. Or, il est indispensable que les solutions restent stables tout au long de l'expérience ; comme nous l'avons exposé au début de ce travail, de telles solutions n'ont pu être préparées qu'après de longues recherches.

A - RELATION EXISTANT ENTRE LA VITESSE D'ABSORPTION D'OXYGENE ET LA CONCENTRATION EN CATALYSEUR.

La technique utilisée pour les mesures de vitesse de consommation d'oxygène a été exposée en détail au cours du premier chapitre. Ces expériences ont demandé un soin extrême ; en effet, si une éventuelle contamination des solutions est instantanément décelable par la méthode photométrique, où elle se traduit par une valeur de transmission aberrante, il n'en est pas de même pour la méthode manométrique, où il faut attendre la fin de l'essai pour apprécier la valeur des résultats. On peut s'assurer de la constance du phénomène dans le temps de l'essai en vérifiant que la coloration de la solution est sensiblement identique au début et à la fin de l'expérience ; s'il en est ainsi on peut être certain de la non contamination des solutions par des catalyseurs ou des inhibiteurs au cours des manipulations.

Nous avons constaté que :

1/ Pour chaque dose de catalyseur utilisé, la vitesse de consommation d'oxygène est constante pendant la durée de l'essai.

2/ La vitesse de fixation d'O₂ croît avec la concentration en catalyseur.

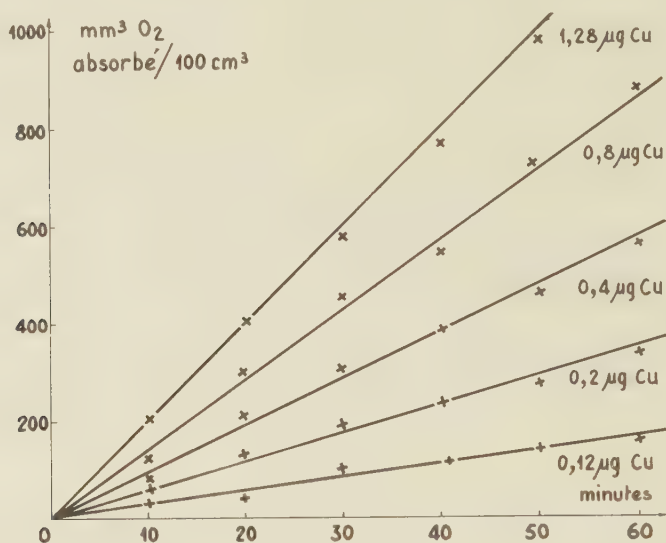


Fig. 15 - Quantité d'oxygène absorbé en fonction du temps par 100 cm³ de solution S, en présence de doses croissantes de cuivre.

La figure 15 traduit les résultats obtenus avec des concentrations croissantes en cuivre ; en abscisses sont représentés les temps : les mesures sont effectuées toutes les 10 minutes, pendant 1 heure ; en ordonnées, les quantités d'oxygène absorbé par 100 cm³ de solution (les volumes sont exprimés en mm³ et ramenés aux conditions normales.)

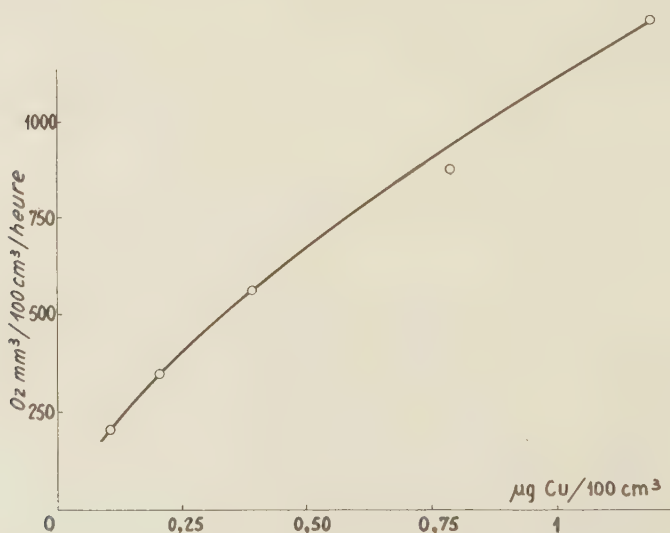


Fig. 16 - Vitesse d'absorption d'oxygène en fonction de la concentration en cuivre.

La courbe de la figure 16 nous renseigne sur la quantité d'oxygène absorbé par 100 cm³ de solution en présence de doses croissantes de catalyseur.

Nous constatons qu'il y a sensiblement proportionnalité entre la vitesse d'oxydation et la concentration en catalyseur. Dans les conditions expérimentales que nous respectons, les concentrations en AH₂ et en oxygène peuvent être considérées comme constantes pendant la durée des essais, en raison de la lenteur de l'oxydation.

L'activité catalytique du cuivre, exprimée en molécules d'oxygène fixé par minute à 25°C sous l'action d'un atome de métal, s'élève à 46,5.

Nous avons remarqué que s'il n'y a aucune addition de catalyseur à la solution S, celle-ci absorbe cependant 15 mm³ d'oxygène pour 100 cm³ pendant 1 heure. Bien que faible, cette vitesse d'absorption traduit une lente oxydation de la solution de base. Ceci est à rapprocher du fait qu'une solution de base bien que préparée avec grands soins se colore toujours faiblement par aération.

B - RELATION ENTRE LA COLORATION DES SOLUTIONS ET LEUR VITESSE DE CONSOMMATION D'OXYGENE.

Les résultats des expériences précédentes nous ont permis de tracer la courbe A (fig. 17) exprimant la relation entre la transmission et la vitesse de consommation d'oxygène pour une addition donnée de cuivre.

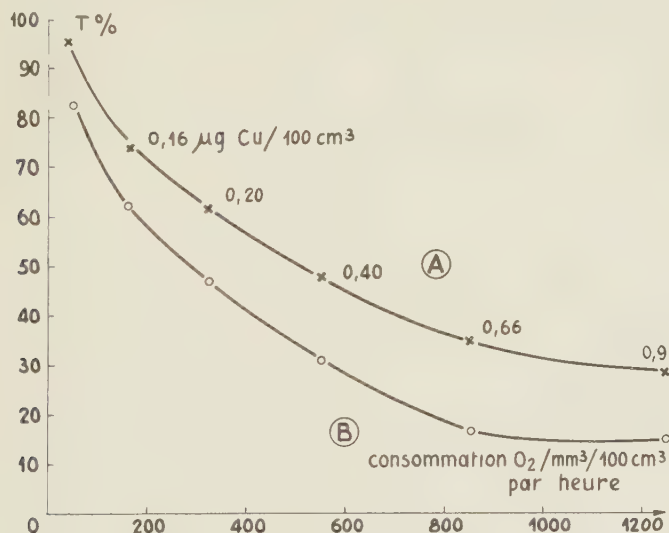


Fig. 17 - Relation entre la transmission et la vitesse de consommation d'oxygène après addition de cuivre à la solution de base.

A - sans peroxydase ; B - 10 µg de peroxydase / 5 cm³.

La courbe B est obtenue en présence de peroxydase, nous y reviendrons ultérieurement.

A l'équilibre de coloration, il apparaît autant de BM par oxydation qu'il en disparaît par réduction selon la réaction :



Or on peut avoir une idée de la vitesse de disparition du BM dans les conditions habituelles de l'essai, en traçant en fonction du temps la courbe de décoloration d'une goutte de solution de BM à 1 % ajoutée à la solution S aérée non additionnée de cuivre.

On note les temps nécessaires pour des augmentations successives de transmission. La courbe 4 permet de connaître la quantité de BM disparu entre ces mêmes limites. On peut alors dresser le tableau V.

Tableau V

Relation entre la variation de coloration des solutions et leur vitesse de consommation d'oxygène						
1	Intervalle de transmission	40 - 50 %	50 - 60 %	60 - 70 %	70 - 80 %	80 - 85 %
2	Temps (en secondes)	84	84	90	150	240
3	BM mg disparu/100 cm ³	0,165	0,120	0,092	0,078	0,038
4	BM mg concentration moyenne	0,490	0,355	0,250	0,165	0,108
5	BM disparu mg/mn	0,118	0,086	0,061	0,035	0,0095
6	$\frac{(5)}{(4)}$	0,240	0,242	0,244	0,212	0,088
7	BM disparu mol. 10 ⁻⁸ /mn	36,9	26,9	19,2	10,9	2,97
8	O ₂ Mol 10 ⁻⁸ /mn consommation moyenne	43,3	32,1	21,9	12,9	7,6
9	$\frac{(8)}{(7)}$	1,17	1,19	1,14	1,18	2,54

Nous constatons :

a) que pour des transmissions comprises entre 40 et 80 % la vitesse de disparition du BM est pratiquement proportionnelle à sa concentration, mais qu'au-delà de 80 %, ce n'est plus le cas (colonne 6).

b) que le rapport entre la quantité d'oxygène fixé et le BM apparu est constant et sensiblement égal à 1,17.

III - INHIBITION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DU CUIVRE

A - GENERALITES

Depuis le début de ce travail, nous avons eu plusieurs fois l'occasion de mentionner l'effet de substances qui perturbaient l'action catalytique du cuivre sur l'oxydation des solutions de base et entraînaient leur décoloration.

L'expérience préliminaire nous a permis de constater que l'addition de glutathion réduit à une solution de base au cours de son oxydation en présence de cuivre, entraînait sa décoloration presque totale (fig. 2).

Dans les réactifs, nous avons mis en évidence la présence d'impuretés capables de fixer le cuivre ; une partie de ces inhibiteurs disparaît au cours du temps si ces solutions de base sont conservées à l'obscurité mais il s'en forme si elles sont exposées à la lumière. Ces inhibiteurs présents à concentration variable sont la cause des irrégularités de sensibilité observées d'une solution à l'autre.

Le cuivre agit à dose si infime qu'il est évident que la moindre trace de substance capable de fixer ce métal modifiera le cours de l'oxydation qu'il catalyse.

L'inhibition de l'activité catalytique du cuivre sur l'oxydation de l'AH₂ a déjà été étudiée par différents auteurs, ainsi que nous l'avons mentionné dans la revue bibliographique (parag. II, C. 7). La dissimulation du métal dans un complexe a souvent été mise à profit pour stabiliser les solutions de vitamine C.

Sur le plan théorique, de nombreuses études ont été consacrées aux modifications de l'activité catalytique d'un métal consécutives à son introduction dans un complexe. G. THULLIER (124) a fait récemment une mise au point des travaux effectués dans cette voie et dont voici l'essentiel :

Un ion métallique peut former avec un donneur d'électrons (généralement l'azote, l'oxygène ou le soufre), un composé de coordination ou complexe. Lorsque l'agent complexant donneur d'électrons contient au moins un cycle, la structure résultante est celle d'un chélat, comme l'ont défini MORGAN et DREW en 1920 (89).

Pour NIKOLAIEV (92), la formation de chélats métalliques permet de faire varier dans de très larges limites l'activité catalytique d'un cation :

- d'une part elle peut entraîner sa dissimulation dans la molécule et ainsi empêcher ou réduire considérablement la vitesse d'une réaction qu'il catalysait ;

- d'autre part, elle peut augmenter très fortement son activité catalytique : PYRIE et VAN HEYMINGEN (104) STADTMAN (114) signalent l'accélération de l'oxydation du GSH par les métaux en présence de complexants du type aminoacide polycarboxyliques. MYERS (90) au cours d'une étude sur la vitesse de séchage de l'huile de lin dans des conditions définies, montre que l'activité catalytique du cobalt n'est pratiquement pas influencée par chélation, mais que celle du fer peut être accrue de 300 % et celle du manganèse de 400 %.

L'activité catalytique des chélats métalliques étant dans certains cas plusieurs dizaines ou centaines de fois supérieures à celles de l'ion métallique libre, on les a considérés comme des modèles très simplifiés d'en-

zymes (92), ces chélats sont d'ailleurs au même titre que les biocatalyseurs doués de spécificité.

Au cours de notre travail, nous n'avons jamais rencontré d'exemples d'activation du cuivre. Cela semble être la règle. D'après CHALK et SMITH (14) le fait que l'activité catalytique du cuivre ne puisse être accrue par chélation peut résulter de ce que les transitions $\text{Cu}^{++} - \text{Cu}^{+}$ nécessitent une importante énergie libre quand le métal est chélaté. Les ions Cu^{+} et Cu^{++} ont un nombre de coordination de 4, mais les premiers ont une disposition planaire tandis que les derniers ont une disposition tétraédrique.

Seul DOBRY (24) signale une exaltation de l'activité catalytique du cuivre en présence d'EDTA dans l'oxydation de l'huile de transformateur. Ne serait-ce pas plutôt une exaltation du fer ?

Notre étude sur la formation des complexes a été limitée à la recherche des substances qui, à très faible concentration, pouvaient modifier l'activité catalytique des ions cuivre dans les conditions imposées par notre réaction colorée : composition du milieu constante, pH 4,1, concentration en cuivre extrêmement faible. Nous ne nous sommes attardés ni sur la structure des substances capables de fixer le cuivre, ni sur la nature des liaisons qui les unissent au métal. Pour des raisons de commodité, nous adopterons le terme général de "complexant" pour toute substance capable de modifier l'activité catalytique du cuivre, et nous appellerons complexe la combinaison elle-même.

Nous devons préciser dès à présent que, même si l'on ajoute une quantité suffisante d'inhibiteur pour bloquer immédiatement toute oxydation de la solution de base, la vitesse de décoloration ne peut être supérieure à la vitesse de réduction du BM présent, par l' AH_2 ; ainsi, la coloration suit avec un certain retard les variations rapides de la vitesse d'oxydation. Il faut compter une dizaine de minutes pour que la coloration atteigne sa valeur d'équilibre : ce délai est de l'ordre de grandeur de celui qui est nécessaire à la stabilisation de la couleur après addition d'un inhibiteur.

Nous avons étudié l'action de certains corps contenant du soufre dont on connaît l'affinité pour le cuivre, en particulier, le glutathion, la cystéine, la thiourée, la méthionine, le diéthylthiocarbamate (DIECA), puis celle des acides aminés en général et celle des complexes.

Nous avons enfin étudié l'effet des substances sulphydrilées qui se forment par insolation d'une solution d' AH_2 renfermant BMH_2 et montré leur présence inévitable dans les solutions de base, malgré tout le soin apporté à la préparation de celles-ci.

Indépendamment d'une meilleure compréhension des phénomènes observés au cours de l'étude de la réaction colorée elle-même, le rôle des inhibiteurs du cuivre mérite d'être précisé car ils interviennent dans l'oxydation catalytique de nombreux produits d'origine naturelle. La catalyse d'oxydation par les métaux lourds a une importance pratique considérable dans les boissons (bière, vin, cidre, jus de fruits) et s'effectue dans un domaine de pH et de concentrations en catalyseurs assez voisin du nôtre, pour que les conclusions tirées de notre étude théorique puissent être appliquées aux cas pratiques.

1/ Etude comparative de l'action de doses croissantes des différents inhibiteurs sulphydrylés

La figure 18 nous indique que le DIECA a une très grande affinité pour le cuivre. Malgré la forte dilution des réactifs, il suffit d'une addition de DIECA sensiblement stœchiométrique pour inhiber totalement l'activité catalytique du cuivre. 0,03 μg de DIECA décolorent totalement 5 cm^3 de solution T additionnée de 0,01 μg de cuivre. Cette forte affinité est connue, et DELEPINE (23) a mis à profit la formation d'un complexe brun DIECA/Cuivre, très stable, soluble dans le chloroforme, pour doser colorimétriquement ce métal.

Avec les autres inhibiteurs, l'arrêt total de l'oxydation catalytique exige la présence d'un excès de complexant d'autant plus important que son affinité pour le métal est plus faible : les courbes de la figure 18 donnent une idée de l'efficacité relative du DIECA, du glutathion, de la cystéine, de la thiourée.

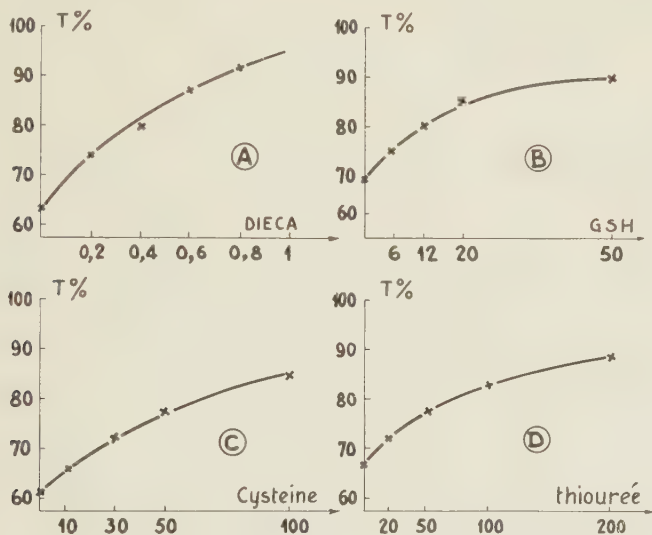


Fig.18 - Transmission à l'équilibre donnée par 5 cm^3 de solution T contenant 0,01 μg de Cu additionnée de doses croissantes d'inhibiteurs.

A - diéthyl dithio carbamate ; B - glutathion ; C - cystéine ; D - thiourée.

En abscisses sont indiqués les rapports moléculaires entre l'inhibiteur et le catalyseur.

2/ Influence de la durée de la catalyse sur la décoloration des solutions après addition de l'inhibiteur

Il est intéressant de remarquer qu'après addition de doses identiques d'un inhibiteur donné, les décolorations des solutions varient avec la durée de la catalyse antérieure.

a) Expériences

Les résultats des observations faites au cours de l'étude de l'action

inhibitrice de la cystéine, du glutathion et de la méthionine sont transcrits dans le tableau VI

Tableau VI

Variation de la coloration des solutions additionnées d'une même dose d'inhibiteur après des temps variables d'oxydation catalytique

CYSTEINE

A	T ₁ % 8 cm ³ sol. T + 0,04 µg Cu	BM ₁ en µg/8 cm ³	Durée de la cata- lyse en minutes	T ₂ % après addition de 6 µg cystéine	BM ₂ en µg/8 cm ³	BM ₁ - BM ₂ en µg	$\frac{BM_1 - BM_2}{BM_1}$
1	16 %	15,91	4	78 %	1,71	14,20	89,5 %
2	16 %	15,91	20	75 %	2,02	13,89	87,3 %
3	15,2 %	16,84	38	64 %	3,27	13,57	80,5 %
4	18 %	14,97	67	63 %	3,43	11,54	77,3 %
5	24 %	11,80	120	59 %	3,90	6,90	60,4 %
5'	+peroxydase 14,5 %	17,10	120	47 %	6,24	10,90	64 %

GLUTATHION

B	T ₁ % 8 cm ³ sol. T + 0,02 µg Cu	BM ₁ en µg/8 cm ³	Durée de la cata- lyse en minutes	T ₂ % après addition de 2,5 µg GSH	BM ₂ en µg/8 cm ³	BM ₁ - BM ₂ en µg	$\frac{BM_1 - BM_2}{BM_1}$
1	59 %	3,90	5	72,5 %	2,30	1,60	41 %
2	64 %	3,43	12	72 %	2,49	0,94	27,2 %
3	66 %	3,12	40	70 %	2,65	0,47	15,1 %
4	67 %	2,96	120	71 %	2,56	0,40	13,5 %
1'	66 %	3,12	aération 120 minutes puis 5 mm de catalyse	72 %	2,49	0,63	20,2 %

METHIONINE

C	T ₁ % 8 cm ³ sol. T + 0,04 µg Cu	BM ₁ en µg/8 cm ³	Durée de la cata- lyse en minutes	T ₂ % après addition de 1 mg méthionine	BM ₂ en µg/8 cm ³	BM ₁ - BM ₂ en µg	$\frac{BM_1 - BM_2}{BM_1}$
1	14 %	17,47	15	64 %	3,27	14,20	81,5 %
2	21,4 %	13,10	60	56 %	4,36	8,74	66,5 %
3	33 %	9,10	120	48 %	5,92	3,18	35 %
4	33,4 %	8,73	180	43,5 %	6,86	1,87	21,5 %

T₁ % représente la transmission donnée par 8 cm³ de solution T en présence de 0,04 µg (expérience A et C), de 0,02 µg de cuivre (expérience B). Ces valeurs sont mesurées juste avant l'addition de l'inhibiteur.

T₂ % représente la transmission maxima des solutions après l'addition du complexant (soit environ 15 minutes après).

Afin de pouvoir comparer les valeurs de ces transmissions, nous les avons traduites en concentration de BM.

La différence entre BM₁ et BM₂ concentration de BM avant et après addition de l'inhibiteur traduit l'éclaircissement des solutions sous l'action de l'agent complexant.

BM_1 diminuant dans des proportions assez importantes avec la durée de la catalyse (comme on peut le constater en lisant la colonne 2), nous avons donné en dernière colonne le rapport entre $(BM_1 - BM_2)$, quantité de BM disparu par l'addition de l'inhibiteur, et BM_1 quantité de BM présent au moment de son introduction.

Nous constatons que ce rapport est d'autant plus faible, c'est à dire les décolorations d'autant moins importantes que la solution a subi une oxydation antérieure plus longue. (Les durées de l'oxydation catalytique sont transcrites dans la 3ème colonne).

Les résultats obtenus avec la cystéine ont permis de tracer les courbes de la figure 19.

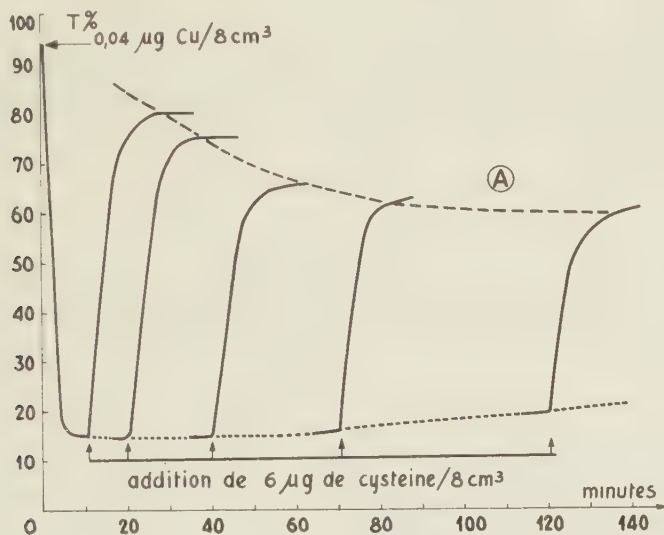


Fig.19 - Transmissions données par 5 cm³ de solution T additionnée de 6 µg de cystéine après des temps variables d'oxydation catalytique entraînée par 0,04 µg de Cu. En abscisses ; la durée de la catalyse.

La courbe A donne, en transmission, les colorations résiduelles après inhibition de la catalyse, en fonction de la durée de l'oxydation catalytique.

b) Interprétation

La forme de cette courbe peut être interprétée en tenant compte de deux phénomènes :

1/ La quantité d'acide déhydroascorbique formée est suffisamment grande pour que le rapport A/AH_2 qui commande BM/BM_2 ne puisse être considérée comme négligeable (voir chapitre V). Il s'en suit que pour des essais prolongés la coloration ne nous renseigne plus sur la concentration en catalyseur actif.

2/ Il existe dans le milieu une quantité d' H_2O_2 croissant avec le temps et l'intensité d'oxydation (voir chapitre IV). Cette eau oxygénée peut servir partiellement à l'oxydation de l'inhibiteur sulfhydrylé ⁽¹⁴²⁾ donnant naissance à des composés au pouvoir d'inhibition moindre ⁽¹⁴¹⁾.

On peut montrer que le glutathion oxydé GSSG préparé à partir du GSH soit par oxydation spontanée à l'air soit par oxydation par l'iode, ne complexe pas le cuivre dans nos conditions expérimentales.

On peut également montrer que l'utilisation d'une solution de cystine, préparée à partir du produit commercial ou encore par oxydation de la cystéine par l'iode, n'entraîne pas l'inhibition de l'activité catalytique du cuivre. Nous avons observé cependant que l'addition de quelques dixièmes de mg de cystine à 5 cm³ de solution de base, en cours d'oxydation en présence de 0,04 µg de cuivre, était suivie d'une très lente décoloration de l'essai. Nous supposons que cet effet inhibiteur n'est pas dû à la cystine mais probablement à la cystéine apparue par l'établissement très lent d'un équilibre entre le système cystine-cystéine et A/AH₂.

Il n'y a pas unanimité entre les chercheurs qui se sont occupés des pouvoirs protecteurs qu'exercent cystéine et cystine sur l'oxydation de l'acide ascorbique en présence de cuivre. Pour DE CARO et GIANI (20), ils sont très différents, pour MAWSON (185), ils sont sensiblement égaux, pour BHADURY (6), la cystine ne peut complexer le cuivre.

La vérification des phénomènes précédemment mentionnés : variation du rapport BM/BMH₂, oxydation de l'inhibiteur sulphydrilé par l'eau oxygénée présente, peut se faire en associant les mesures manométriques et colorimétriques. (Tableau VII).

Tableau VII

Action de la cystéine additionnée après des temps variables d'oxydation catalytique sur la vitesse d'absorption d'O₂ et la coloration des solutions

	Essais	Consommation d'O ₂ en mm ³ 10 cm /heure	Transmission
1	10 cm ³ solution S	1,5 mm ³	93 %
2	10 cm ³ solution S + 0,08 µg Cu	90 mm ³	17 %
3	10 cm ³ solution S + 0,08 µg Cu + 15 µg cystéine	1,5 mm ³	93 %
4	10 cm ³ solution S + 0,08 µg Cu après 4 heures d'oxydation + 15 µg cystéine	15 mm ³	37 %
5	10 cm ³ solution S + 0,08 µg Cu + 40 µg peroxydase après 4 heures d'oxydation + 15 µg cystéine	1,5 mm ³	25 %

La vitesse d'oxydation de la solution de base, en présence et en l'absence de cystéine est la même ($1,5 \text{ mm}^3/10 \text{ cm}^3/\text{h}$). L'addition simultanée de cuivre ($0,08 \text{ } \mu\text{g}$) et de cystéine ($15 \text{ } \mu\text{g}$) à l'origine n'entraîne aucun changement. (essai 3).

Mais si l'oxydation a été poursuivie 4 heures en présence de cuivre, la même quantité de cystéine ne peut ni inhiber complètement l'oxydation ni décolorer totalement la solution (essai 4).

Si la même oxydation a eu lieu pendant 4 heures en présence de peroxydase, qui empêche l'accumulation d' H_2O_2 , la cystéine conserve son pouvoir inhibiteur et ramène la vitesse d'oxydation à $1,5 \text{ mm}^3/10 \text{ cm}^3/\text{h}$. Malgré la faible vitesse d'oxydation la coloration de la solution reste très forte, (essais 4 et 5).

3/ Etude de l'équilibre existant entre le cuivre et l'inhibiteur

Les courbes de la figure 18 suggèrent qu'il doit exister un équilibre entre l'inhibiteur et le cuivre ; il apparaissait intéressant à priori, de préciser le phénomène.

Prenons comme exemple le cas de glutathion.

Posons que l'équilibre est du type :



et que seul l'ion Cu^+ est doué d'activité catalytique.

Il semblerait que l'on puisse déduire des mesures colorimétriques un ordre de grandeur pour la constante d'équilibre

$$\frac{(\text{GS}^-) (\text{Cu}^+)}{(\text{GSCu})} = K$$

Mais, bien que l'on connaisse le cuivre total et le glutathion introduits, bien que l'on puisse exprimer l'activité résiduelle due au cuivre libre d'après la courbe d'étalonnage de la solution de base utilisée, on ne connaît pas la concentration réelle (Cu^+). Nous montrerons plus loin (chapitre V) que seule une faible fraction de cuivre introduit existe à l'état cuivreux et est responsable de l'oxydation catalytique.

Quant à (GS^-), il résulte aussi d'un équilibre



fonction notamment du pH du milieu.

Puisqu'on travaille à pH constant, et à concentration en acide ascorbique constante, (essais de peu de durée), Cu^+ et GS^- sont fonction respectivement des quantités de cuivre et de glutathion ajoutées, et à défaut de pouvoir calculer la constante d'équilibre K précédente, on peut chercher si le rapport

$$\frac{(\text{GSH}) (\text{Cu libre})}{(\text{GSCu})} \text{ est constant} = K'$$

lorsque pour une concentration constante en cuivre, on fait varier les concentrations en GSH.

On pose :

$$(\text{Cu libre}) + (\text{GSCu}) = (\text{Cuivre ajouté})$$

$$\text{et } (\text{GSCu}) + (\text{GSH}) = (\text{Glutathion ajouté}).$$

Tableau VIII

Etude de l'équilibre existant entre le cuivre et le glutathion

Cuivre ajouté : $0,02 \mu\text{g}/8 \text{ cm}^3$; soit $(\text{Cu}) = 3,95 \cdot 10^{-8}$						
GSH ajouté en $\mu\text{g}/8 \text{ cm}^3$	GSH ajouté en $10^{-8}/\text{mol}/\text{l}$	(Cu) libre en $\mu\text{g}/8 \text{ cm}^3$	(Cu) libre en $10^{-8} \text{ mol}/\text{l}$	(GSCu) en 10^{-8} mol/l	(GSH) en 10^{-8} mol/l	K' 10^{-8}
0,194	7,9	0,016	3,14	0,79	7,1	28,4
0,39	15,9	0,014	2,75	1,19	14,7	34,0
0,58	23,7	0,0124	2,43	1,50	22,2	36,0
0,77	31,5	0,0112	2,2	1,74	29,7	37,5
0,97	39,5	0,0092	1,81	2,12	37,4	32,0
1,45	59,2	0,008	1,57	2,36	56,8	37,8
1,94	79,5	0,0056	1,1	2,82	76,7	29,9
4,85	197	0,0032	6,3	3,30	193,7	37,0

Bien que très approximatives, ces valeurs montrent une certaine constance du rapport K' .

L'imprécision des résultats peut être expliquée par le fait que ces essais ont été entrepris à un moment où nos solutions de base, encore contaminées par des inhibiteurs, n'avaient pas la sensibilité maxima. Le manque de temps ne nous a pas permis de reprendre cette question.

C - ACTION DES COMPLEXONS

Les complexons sont des substances organiques qui ont la propriété de former avec les métaux des complexes plus ou moins stables. Depuis les travaux de SCHWARZENBACH (110) ces réactifs ont trouvé de très importantes applications en chimie analytique (81), le plus employé étant le complexon III, c'est-à-dire le sel disodique de l'acide éthylène-diamine tétracétique (E.D.T.A.). En général une molécule d'EDTA réagit avec 1 atome de métal, quelle que soit la charge de l'ion métallique. Les complexes formés sont d'autant moins stables que le pH est plus bas.

L'action inhibitrice des complexons sur l'activité catalytique du cuivre vis à vis de l'oxydation de l' AH_2 a déjà été étudiée par FLITMAN et FRIEDEN (33), JAGER (63). Les résultats de nos premières expériences furent assez surprenants : Contrairement à toute attente, l'addition d'EDTA à la solution de base aérée, y provoque l'apparition d'une coloration. Celle-ci croît avec la quantité d'EDTA ajoutée et atteint une limite pour quelques μg d'EDTA/ 5 cm^3 . La limite, constante pour une même solution de base, peut varier de l'une à l'autre entre 80 et 60 % de transmission. Cette coloration ne peut être due à des traces de cuivre présentes comme impureté dans le réactif utilisé, car d'une part aucun des inhibiteurs de l'action catalytique de ce métal ne modifie la coloration apparue après addition des complexons, et d'autre part, une addition supplémentaire de cuivre n'entraîne aucune augmentation.

Ceci nous permet d'affirmer que l'EDTA fixe les ions cuivre en formant un complexe inactif sur la solution de base.

Nous verrons que la coloration des solutions de base additionnées d'EDTA est due à l'activation considérable de l'effet catalytique des ions fer présents comme impuretés dans le milieu.

D - ACTION DES ACIDES AMINES

Tous les acides aminés nous ont été gracieusement fournis par le Laboratoire HOFFMANN - LA ROCHE que nous tenons à remercier ici.

Il est connu depuis longtemps que les acides aminés sont capables de fixer le cuivre (74) ; leurs complexes de cuivre facilement cristallisables sont souvent utilisés pour leur extraction et leur purification (69).

D'après BUNATYAN (10) l'alanine, l'histidine, l'acide glutamique, l'acide aspartique, l'asparagine retardent l'oxydation catalytique de l' AH_2 . Pour PETERSON et WALTON (101) les inhibiteurs les plus efficaces de l'action du cuivre sont la cystéine, l'acide urique, l'acide aspartique, l'acide glutamique.

PASQUIER et MACHEBOEUF (98) (99) ont extrait le cuivre de ses complexes avec les protéines, par les acides suivants classés par efficacité décroissante : l'acide urique, l'acide aspartique, l'acide glutamique. Récemment KIRSON et BARSILY (68) étudièrent la formation de complexes du cuivre avec l'asparagine, l'acide glutamique, l'acide aspartique et la glutamine. Ils précisèrent que le complexe bi-asparagine, qui généralement précipite en milieu aqueux 20 à 30 minutes après le mélange des solutions, n'apparaît qu'après un temps beaucoup plus long si la concentration en cuivre est inférieure à 0,066 mole par litre (pH optimum de formation : 6,5) A pH 7 le complexe cuivre - biglutamine précipite en 10 à 20 minutes après le mélange des solutions, si la concentration en cuivre est supérieure à 0,0166 mole/litre. D'après KOICHIRO HOUDA (71) la stabilité de la liaison $\text{Cu} - \text{NH}_2$ varie avec le pH ; pour des pH compris entre 1 et 4 les sels de Cu des acides monoamino monocarboxylés sont totalement dissociés en anions et cations, ceux des acides aminés basiques et acides ne le sont que partiellement ; tous ces complexes métalliques sont stables à pH 6,2.

Cette brève revue bibliographique nous laissait espérer une application possible de notre réaction colorée à la détermination de l'ordre de grandeur des constantes de dissociation des complexes de cuivre des acides aminés, dépourvus d'activité oxydasique.

Nous avons été surpris de constater que l'addition d'acides aminés non soufrés (quantités allant jusqu'à 1 mg/5 cm³) à la liqueur de base additionnée de 0,02 µg de cuivre n'entraîne généralement aucune modification de coloration. Il en est ainsi pour : glyocolle, alanine, valine, phénylalanine, acide aspartique, arginine, proline, tryptophane, asparagine.

L'histidine, la sérine, l'acide glutamique à la concentration de 1 mg/5 cm³, entraînent un léger éclaircissement des solutions correspondant respectivement à 1/4, 1/3 et 1/7 du cuivre présent.

Ces inhibitions sont de trop faible intensité pour que cette étude présente un intérêt.

L'impossibilité devant laquelle nous nous sommes trouvés d'inhiber l'action catalytique du cuivre par addition d'acides aminés, est vraisemblablement due aux conditions expérimentales d'acidité et de concentration imposées, très étroitement définies, incompatibles avec la formation des complexes de cuivre (71) (68).

E - FORMATION D'INHIBITEURS PAR INSOLATION

Au début de nos recherches, nous avons remarqué que si les solutions

d'AH₂ et BM conservées sous azote étaient exposées à la lumière, elles perdaient leur sensibilité au cuivre (2ème partie, chapitre II, parag. 1 A).

Cherchant la cause de ce phénomène, nous avons mis en évidence la formation de substances renfermant des groupements sulfhydrylés, lors de l'insolation de la solution de base en l'absence complète d'oxygène. Par oxydation, une partie des combinaisons ainsi formées est détruite, ce qui explique l'augmentation de sensibilité observée après quelques heures d'aération de la solution de base.

Nous décrirons avec quelques détails les expériences qui nous ont permis d'établir ces conclusions.

1/ Etude expérimentale

Nous préparons sous azote et à l'obscurité 100 cm³ d'une solution $\frac{M}{10}$ d'AH₂ contenant 10 cm³ d'une solution de BM à 0,1 %. Nous soutirons directement dans la cuve de mesure 8 cm³ de cette solution, puis y ajoutons 1 µg de cuivre. L'instant de la mise en route du barbotage d'air est prise comme origine des temps. On observe une baisse rapide de la transmission en fonction du temps (courbe 1 de la figure 20) l'enregistrement est poursuivi pendant 1 heure.

Le restant de la solution est soumis à la lumière d'une lampe à vapeur de mercure (H P 125 W Philips - distance lampe - solution 20 cm) pendant 1 minute. On fait alors une mesure colorimétrique dans les mêmes conditions que précédemment (courbe 2)

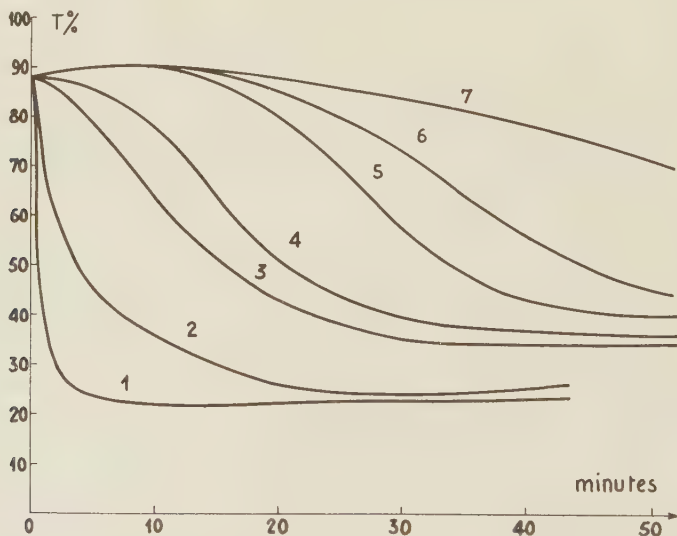


Fig.20 - Variation de la transmission en fonction du temps après addition d'1 µg de cuivre dans 8 cm³ de solution après une durée d'insolation variable.

Courbes n° 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7
Insolation (minutes) 0 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32.

Les courbes 3, 4, 5, 6, 7 ont été obtenues de la même manière pour des temps d'éclairement respectifs de 2, 4, 8, 16, 32 minutes.

Le réseau des courbes ainsi obtenu montre que :

1/ L'effet inhibiteur est d'autant plus marqué que l'insolation est de plus longue durée.

2/ L'inhibition disparaît au cours de la mesure colorimétrique d'autant plus vite que l'insolation a été plus brève.

3/ Il persiste cependant une certaine inhibition irréversible, puisque le palier de transmission obtenu en fin d'expérience se relève quand le temps d'insolation croît.

4/ Nous avons vérifié que, si la solution est aérée immédiatement après l'insolation, et si l'addition de cuivre n'a lieu qu'après un certain temps d'aération, tout se passe comme si l'insolation avait été de moins longue durée.

Ces courbes, obtenues avec une dose de cuivre volontairement très forte par rapport à celles habituellement utilisées avec les solutions les plus sensibles, sont particulièrement démonstratives. On conçoit sans peine que l'effet inhibiteur puisse déjà être très sensible, même si la solution n'a été soumise qu'à des éclaircissements de faible intensité, lorsque la dose de cuivre utilisée représente seulement quelques millièmes de μg .

2/ Nature possible des inhibiteurs

Puisque l'insolation d'une solution d' AH_2 exempte de BM n'entraîne aucun changement de ses propriétés, c'est donc le leucobleu qui subit la photolyse. Nous venons de montrer le rôle des substances renfermant le radical sulfhydrylé comme inhibiteurs de l'oxydation de l' AH_2 par l'oxygène en présence de cuivre. Cela nous a conduits à penser que la photolyse du leucobleu provoque la mise en liberté de tels groupements. Le plus simple est SH_2 qu'on peut très facilement mettre en évidence.

Nous avons préparé une solution assez concentrée d' AH_2 et de BM (1 g d' AH_2 , 0,1 g de BM dans 50 cm^3) où nous avons fait barboter un lent courant d'azote qui lèche ensuite une bandelette de papier humide, imprégnée d'acétate de plomb.

- Si la solution est maintenue à l'obscurité, le papier ne présente aucune trace de noircissement en 10 minutes.

- Si elle est soumise à une insolation intense, il apparaît sur le papier une très nette tache brune. L'entraînement d' SH_2 ainsi formé se poursuit pendant plus d'une demi-heure après l'arrêt de l'insolation.

- Si le courant d'azote est remplacé par un courant d'air, il ne se produit aucune tache brune, même si la solution est soumise à une insolation intense.

SH_2 ne peut être le seul responsable de l'inhibition précédemment observée. En effet, si l'addition d' SH_2 à la cuve de mesure inhibe bien l'activité du cuivre, cette inhibition est irréversible dans les conditions de l'essai ; l'aération est incapable de restaurer même partiellement la sensibilité comme c'est le cas avec la solution de base insolée.

Il faut admettre l'existence d'autres composés inhibiteurs aisément oxydables, dont la forme oxydée serait dépourvue de pouvoir d'inhibition vis à vis de la catalyse du cuivre.

3/ Conclusions

Les expériences décrites offrent non seulement une explication à l'influence de la lumière sur la sensibilité des solutions de base, mais permettent d'interpréter les courbes en S signalées au début de cet exposé (fig. 6

courbe C). Tant qu'il persiste dans l'essai des traces d'inhibiteurs, ceux-ci fixent du cuivre : lorsque certains inhibiteurs sont inactivés par oxydation, le cuivre est libéré et provoque l'oxydation de la solution. De même, nous comprenons maintenant l'augmentation de la sensibilité en cuivre des solutions de base par vieillissement, (chap. II, parag. I A 3°) l'amélioration observée à la suite d'une aération des solutions fraîches, et l'avantage qui résulte de l'emploi pour leur préparation d'une solution vieillie de BM.

F - INHIBITEURS CONTENUS DANS LES SOLUTIONS DE BASE

1/ Mise en évidence

Malgré toutes les précautions prises pour la préparation et la conservation des solutions de base, nous ne pouvons obtenir après addition de cuivre une stabilité de coloration parfaite. La transmission remonte peu à peu, reflétant une baisse lente de la vitesse d'oxydation et c'est un inconvénient qui limite la durée des essais.

Nous avons pensé que ces décolorations étaient probablement dues à une immobilisation progressive du cuivre par fixation lente du métal sur des inhibiteurs présents comme impuretés dans les solutions de base.

Les expériences suivantes vérifient cette hypothèse.

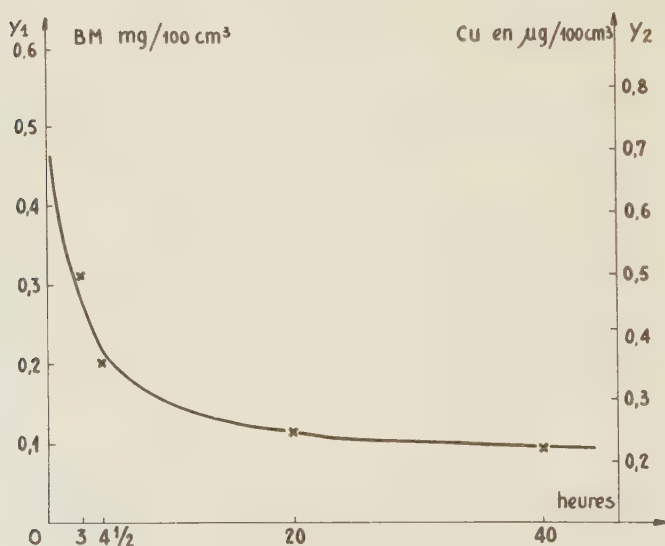


Fig.21 - Fixation du cuivre sur les inhibiteurs contenus dans la solution de base. En abscisse âge de la solution, le temps zéro correspond à l'addition de $0,8 \mu\text{g}$ de cuivre dans 100 cm^3 de solution S conservée sous azote.

En ordonnée : y_1 = concentration en BM après aération de l'essai.

y_2 = concentration en cuivre resté libre dans la solution S.

1/ A 100 cm³ de solution S préparées de la manière habituelle (chap. I parag. II) nous ajoutons (0,8 µg de cuivre - Cette solution est maintenue sous azote et à l'obscurité. Des prélèvements de 5 cm³ sont effectués à des temps variables après addition du cuivre. On fait barboter de l'air purifié dans ces prises d'essai et on enregistre leur coloration.

On constate que la coloration d'équilibre des solutions saturées en oxygène devient d'autant plus faible que la prise d'essai est faite plus tardivement après l'addition du cuivre.

2/ Origine des inhibiteurs

Le BM est en grande partie responsable de cet apport d'inhibiteurs. Nous avons vu (chapitre II, parag. I A 3°) que si les solutions de base étaient préparées avec des solutions de BM fraîches, elles étaient très peu sensibles au cuivre, et que la sensibilité augmentait considérablement si on utilisait des solutions de BM conservées à l'air pendant un certain temps. Il paraît vraisemblable qu'à côté de ces substances oxydables (type GSH) le BM contient également d'autres inhibiteurs insensibles à l'oxydation (type SH₂). Nous avons en effet pu vérifier qu'en augmentant la concentration en BM dans la solution de base, la remontée de transmission indésirable se trouvait accélérée, c'est à dire que la vitesse de disparition de cuivre libre augmentait avec la concentration en BM. Cette constatation permet d'expliquer le fait que des concentrations élevées en BM (fig. 10) inhibent toute sensibilité au cuivre.

L'acide ascorbique apporte également des impuretés capables d'inhiber l'action du cuivre. On explique ainsi que des solutions préparées avec le même BM mais avec des AH₂ de provenances diverses puissent donner lieu à des courbes de transmission d'allure différente.

CHAPITRE III

ÉTUDE DE L'ACTION D'AUTRES CATIONS

Il paraît probable à priori que tout catalyseur d'oxydation de la vitamine C, donnera avec la solution de base, des réactions colorées du même ordre que celles précédemment observées avec le cuivre.

En raison de l'extrême sensibilité de ces solutions aux moindres traces de cuivre, il est très délicat d'attribuer avec certitude à un ion ou à une molécule, une activité catalytique. Des traces de cuivre, indécélables par toute autre méthode analytique, présentes comme impuretés dans le réactif étudié, pourraient naturellement fausser complètement la conclusion que l'on serait amené à tirer prématurément d'essais sommaires. Il est donc indispensable d'utiliser pour ces travaux des sels extrêmement purs et de s'assurer que l'action catalytique éventuellement observée n'est pas due à des traces de cuivre.

La première partie de ce chapitre sera consacrée à l'étude de l'activité oxydasique du fer et de l'argent ; la seconde à la mise en évidence de l'inactivité des autres cations, et nous terminerons par l'étude de l'influence de cations étrangers sur les microdosages de fer et de cuivre.

ACTION DU FER

Le fer, après le cuivre, est le catalyseur d'oxydation de l'AH₂, le plus fréquemment mentionné dans la littérature (66) (95) (88) (9) (118) (105) (17) (59) (86) ; certains auteurs contestent cependant cette activité (77) (4).

Nous avons utilisé des solutions renfermant 1 mg Fe/cm³ ;

l'une de sel de Mohr (MERCK),

l'autre d'alun de fer (RHONE-POULENC) en solution dans de l'eau bidistillée acidifiée par une goutte d'acide sulfurique pur pour 100 cm³.

Notre premier travail fut de reconnaître l'activité des ions fer, puis de nous assurer de la non contamination par le cuivre des solutions de fer utilisées.

Nous nous sommes aperçus que le fer pouvait d'une part entraîner l'oxydation de la solution ascorbique en utilisant l'oxygène de l'air (activité oxydasique), d'autre part, oxyder cette solution aux dépens des peroxydes présents (activité peroxydasique).

A - VERIFICATION DE CETTE ACTIVITE

L'addition de 200 μg de fer à 8 cm^3 de solution de base entraîne une augmentation de transmission qui bientôt se fixe à une valeur voisine de 70 % : l'activité du fer apparaît donc dès les premiers essais comme très inférieure à celle du cuivre.

Afin de nous assurer que cette coloration n'est pas due à une contamination par du cuivre, nous avons ajouté au milieu réactionnel, un excès de glutathion (50 μg) qui comme nous l'avons vu est capable d'inhiber l'action de ces ions. Une telle addition n'entraîne aucune perturbation dans la coloration.

Il est cependant nécessaire de vérifier que le grand excès de fer présent dans le milieu ne perturbe par l'éventuelle fixation des traces de cuivre sur le GSH.

Nous avons réalisé l'expérience suivante :

A 8 cm^3 de solution T additionnée de 200 μg de fer, nous ajoutons, après stabilisation de la teinte, 0,004 μg de cuivre. L'intensité de coloration s'accroît jusqu'à un nouveau palier. On ajoute à ce moment 1 à 50 μg de GSH ; il s'en suit une décoloration partielle correspondant à l'inhibition du cuivre.

Ce phénomène est représenté par la figure 22.

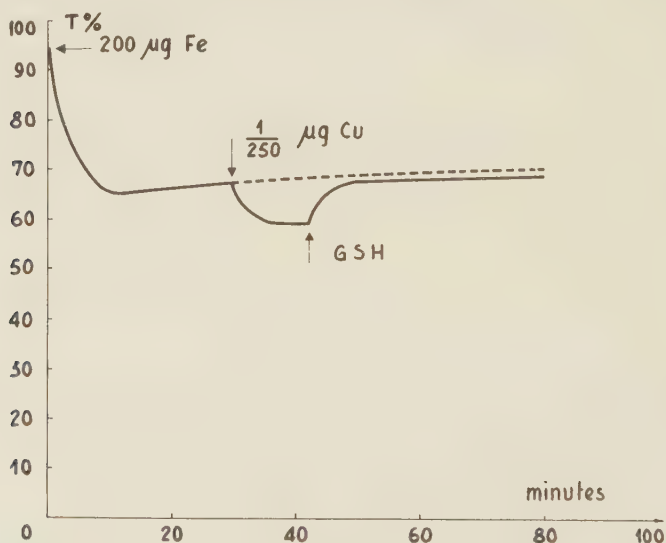


Fig.22 - Courbe montrant l'effet inhibiteur du glutathion sur la catalyse par le mélange Fer + Cuivre.

Ainsi, même en présence d'un grand excès de fer, le GSH est capable de fixer des traces de cuivre, supprimant ainsi l'activité catalytique de ces ions.

L'expérience précédente nous permet d'affirmer que les ions fer sont des catalyseurs d'oxydation de l' AH_2 .

B - VARIATION AU COURS DU TEMPS DE LA COLORATION DES SOLUTIONS ADDITIONNEES DE FER

Les courbes de transmission obtenues après addition de fer aux solutions de base ont une allure particulière, fort différente de celles qui ont été enregistrées lors des catalyses par le cuivre.

Elles présentent en général un minimum variable plus ou moins accusé dans les premières minutes qui suivent l'addition du sel de fer, puis, la coloration se stabilise à un palier qui ne dépend plus que de la concentration en fer. Nous obtenons des résultats semblables que le fer soit utilisé à l'état ferreux ou ferrique.

L'intensité du minimum de transmission n'est pas seulement fonction de la quantité de fer ajouté, mais elle dépend également de la durée du barbotage d'air dans la solution avant l'addition du catalyseur. Les courbes de la figure 23 ont été obtenues après addition de $28\text{ }\mu\text{g}$ de fer à 8 cm^3 de solution T après des temps de barbotage d'air variant entre 0 et 120 minutes

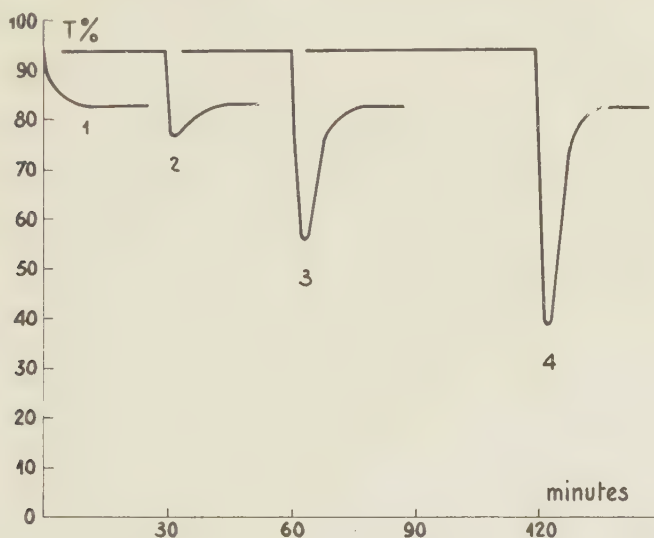


Fig.23 - Influence du temps d'aération de la solution T, sur la forme de la courbe de transmission en fonction du temps, après addition de 28 gammas de fer pour 8 cm^3 .

Nous démontrerons que cette importante libération de BM au début de la catalyse est due à la décomposition de l'eau oxygénée qui s'est accumulée dans le milieu avant l'addition du fer.

C - COURBES DE SENSIBILITE AU FER

1/ Relation entre la transmission à l'équilibre et la concentration en fer

Lorsque l'excès de BM libéré au moment de l'addition du fer a été réduit par l' AH_2 , les solutions présentent une coloration parfaitement stable.

La transmission correspondant à ces paliers est d'autant plus faible que la quantité de fer ajoutée est plus importante. Comme dans le cas d'une

catalyse par le cuivre on peut tracer les courbes d'étalonnage au fer des solutions étudiées (courbe de la fig. 24).

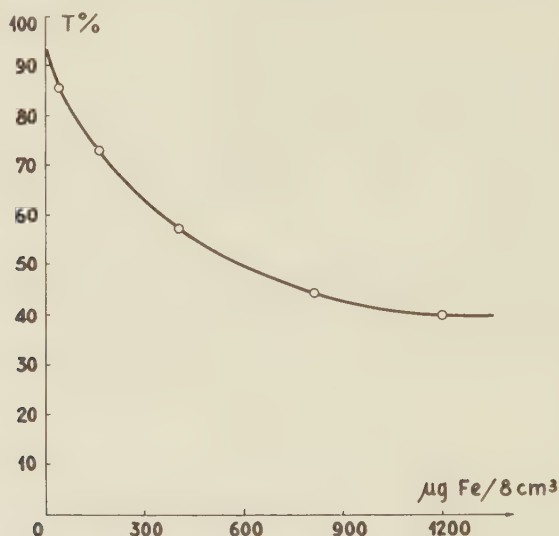


Fig.24 - Transmission en fonction de la concentration en fer.

Pour les fortes teneurs en fer, on a utilisé une solution à 10 mg de fer/cm³ et vérifié que le pH du contenu de la cuve ne subissait aucune variation sensible lors de l'addition du catalyseur.

La comparaison des courbes de sensibilité au fer et au cuivre de la solution S (fig. 24 et 13) met en évidence que pour des quantités relativement faibles de catalyseur, le fer est environ 15 000 fois moins actif que le cuivre, alors que pour des doses plus élevées l'activité catalytique croît moins vite que la concentration en catalyseur ; le rapport d'activité tombe à 1/30 000.

2/ Relation entre la concentration en BM et la concentration en fer

Comme pour le cuivre, on a tracé la courbe reliant la concentration en BM à l'équilibre, à la concentration en fer qui lui a donné naissance (courbe 25).

Contrairement à ce qui se passe dans le cas du cuivre, la concentration en BM n'est plus proportionnelle à la concentration en catalyseur. On ne peut plus parler de coefficient d'amplification comme dans le cas de la catalyse par le cuivre, car le BM à l'équilibre représente seulement quelques centièmes de celui qui se produirait dans la réaction.



D - AUGMENTATION DE L'EFFET CATALYTIQUE DU FER EN PRESENCE DE COMPLEXON-MICRODOSAGE DU FER

En étudiant l'action de divers réactifs classiques des métaux lourds sur l'effet catalytique du fer au cours de l'oxydation des solutions d'AH₂ contenant du BM, on a constaté (15) que le complexon III, non seulement inhibait l'action des ions cuivre, mais augmentait fortement l'action des ions fer.

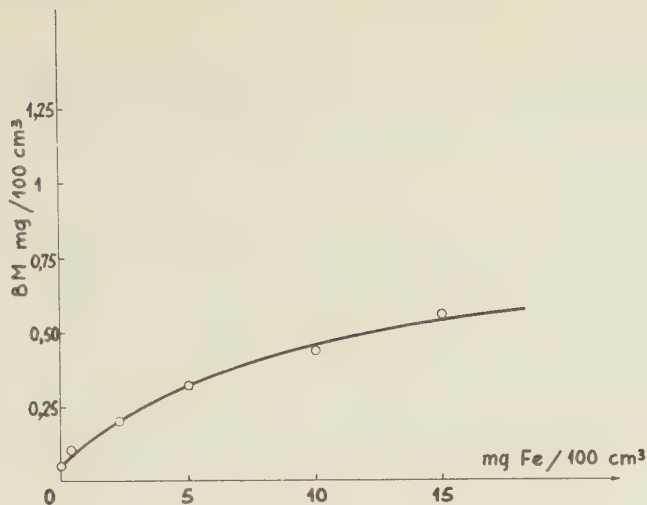


Fig.25 - Relation entre la concentration en BM et la concentration en fer qui lui donne naissance.

Ces observations ont permis la mise au point d'un microdosage de fer dans un milieu minéral même s'il contient du cuivre. La sensibilité de la méthode est de l'ordre du 1/100 de μg de fer dans 5 cm^3 (fig. 26 A). L'activité du composé EDTA/Fer estimée par voie colorimétrique est 550 fois plus forte que celle du fer libre correspondant.

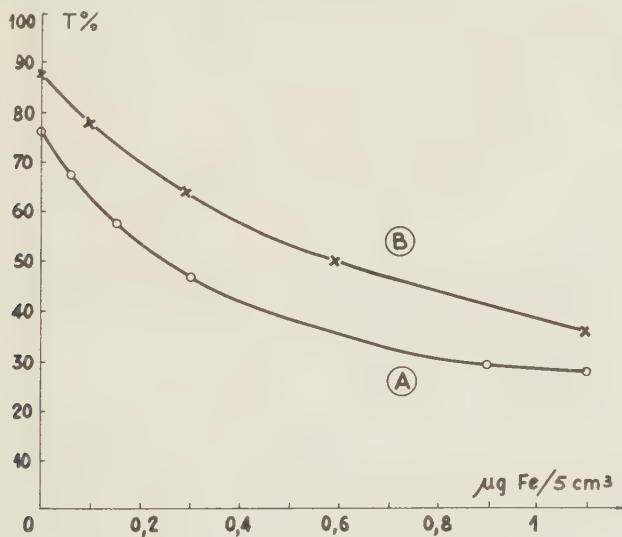


Fig.26 - Transmission en fonction de la quantité de fer

A - en présence de complexon III (solution C) ; B - en présence de complexon I.

Précisons que pour effectuer ces dosages on utilise une solution de base dénommée C contenant 100 mg d'EDTA par litre, et que l'introduction de fer dans la cuve de mesure doit être précédée d'une addition de 10 μg de peroxydase pour 5 cm^3 de solution. Il a été montré qu'en absence de pe-

roxydase H_2O_2 formée au cours de l'oxydation catalytique de AH_2 s'accumule dans la solution où elle perturbe la mesure colorimétrique. L'addition de peroxydase entraîne la décomposition de H_2O_2 au fur et à mesure de sa formation, les équilibres de teinte sont alors rapidement atteints et remarquablement stables.

Le complexon I jouit des propriétés voisines de celles du complexon III (fig. 26 B). Mais d'une part, l'exaltation de l'effet catalytique du fer qu'il provoque est sensiblement deux fois plus faible, et d'autre part, son complexe de cuivre n'est pas aussi stable, de sorte que l'interférence du cuivre sur le dosage du fer n'est pas complètement exclue.

Les complexons ont transformé le couple $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ dont le potentiel de demi réduction vis à vis de l'électrode au calomel saturé dans les conditions de la technique colorimétrique est de + 220 mV en de nouveaux couples EDTA ferreux/EDTA ferrique dont le potentiel dans les mêmes conditions est de - 130 mV, et NTA ferreux/NTA ferrique dont le potentiel est de + 35 mV.

Remarque : Les résultats précédents permettent d'avancer que les colorations observées après addition de complexon III à la solution de base (chap. II, parag. III c) sont dues à l'exaltation de l'effet catalytique des traces de fer apportées sous forme d'impuretés par les réactifs.

Nous pensons donc avec SCHUMMER (109) que la faible absorption d'oxygène par les solutions de base non additionnées de catalyseur (chap. II, parag. II A) et leur légère coloration (fig. 21) est due à la présence de ces traces de fer. Cette faible oxydation ne peut en effet être due à des traces de cuivre car l'addition d'un inhibiteur puissant de l'activité de cet ion tel le DIECA, n'entraîne aucune modification ni dans la coloration ni dans la vitesse d'absorption d'oxygène des solutions de base aérées.

II - ACTIVITE PEROXYDASIQUE DU FER

Dans le paragraphe précédent, nous avons signalé que l'addition de fer à la solution de base aérée provoquait l'apparition d'un minimum de transmission de peu de durée. Nous avons précisé que la libération de BM augmentait avec la quantité de fer ajoutée et avec le temps d'aération de l'essai (fig. 23).

Nous avons pensé que ce phénomène était dû à une destruction de H_2O_2 au moment de l'addition du fer, entraînant une libération de BM. L'expérience suivante va en effet permettre de vérifier cette hypothèse.

Expérience : après 5 minutes de barbotage d'air on ajoute aux 5 cm³ de solution S 0,008 µg de cuivre. L'équilibre de transmission étant atteint, on introduit 28 µg de fer. On observe alors une libération de BM beaucoup plus importante qu'en l'absence de cuivre pour la même durée de barbotage.

Si une fois atteint le palier consécutif à la première addition de fer, on en ajoute une nouvelle quantité, on n'observe plus de pointe sur le graphique d'enregistrement. Cette expérience est illustrée par la courbe de la figure 27.

Interprétation : l'eau oxygénée accumulée lors de l'oxydation de AH_2 sous l'effet du cuivre est détruite à l'addition de fer entraînant une libéra-

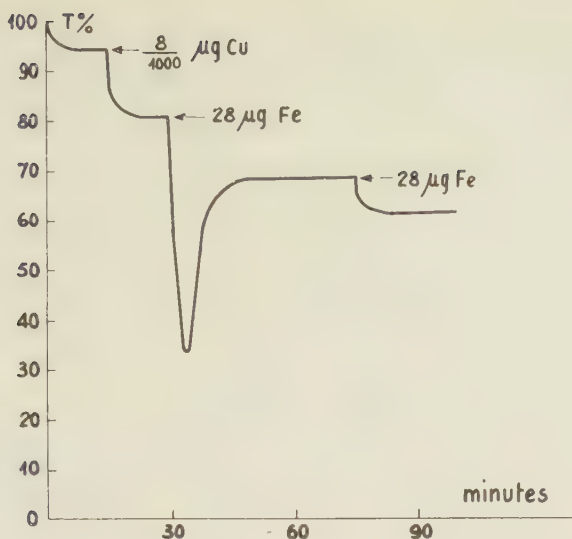


Fig. 27 - Activité peroxydasique du fer.

tion de BM. Une deuxième addition de fer n'est plus suivie d'un minimum de transmission accusé car en présence de suffisamment d'ions fer l' H_2O_2 ne s'accumule plus de façon importante dans le milieu.

Il n'est pas exclu cependant que l' H_2O_2 puisse se former transitoirement au cours de l'oxydation catalytique de l' AH_2 par le fer mais sa vitesse de décomposition doit être telle que sa concentration reste toujours en dessous du seuil de détection par le fer. Ainsi, l'impossibilité de mettre en évidence de l' H_2O_2 libre au cours d'une réaction d'oxydation ne doit pas être une raison suffisante pour écarter l'existence passagère d'un peroxyde ou de radicaux libres intermédiaires.

Nous reviendrons sur ces questions dans le prochain chapitre consacré à la formation et à l'accumulation d' H_2O_2 au cours de l'oxydation catalytique des solutions de base.

III - VITESSE D'OXYDATION DES SOLUTIONS ADDITIONNEES DE FER

La stabilité de la coloration des solutions de base S ou C additionnées de fer est très bonne. Nous avons ainsi pu faire des déterminations satisfaisantes des vitesses d'oxydation pour différentes valeurs de transmission, dans des conditions analogues à celles qui ont été décrites précédemment. Elles nous ont permis de tracer les courbes des figures 28 et 29.

Remarque :

1/ La vitesse d'absorption d'oxygène est sensiblement proportionnelle à la quantité de fer, ceci en présence ou en l'absence de complexe. L'activité catalytique du fer exprimée en molécules d'oxygène fixées par minute à 25° (sous l'action d'un atome de métal) s'élève à $4 \cdot 10^{-3}$ dans le cas d'ions libres et à 1,6 dans le cas où le fer est fixé à l'EDTA.

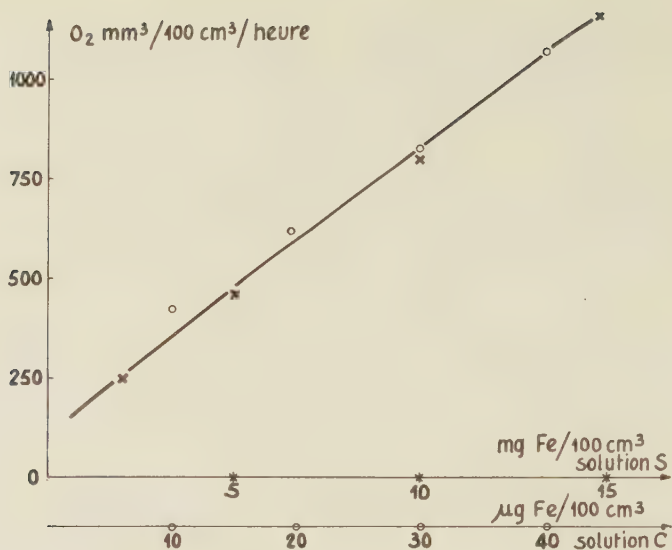


Fig. 28 - Vitesse de consommation d'oxygène en fonction de la quantité de fer ajoutée à :
A - Solution S ; B - Solution C.

Le rapport de ces activités s'élève à 400.

2/ A coloration égale, la consommation d'oxygène est moindre lorsque la catalyse est assurée par Fe EDTA (courbe B, figure 29) que par les ions Fer libres (courbe A - figure 29).

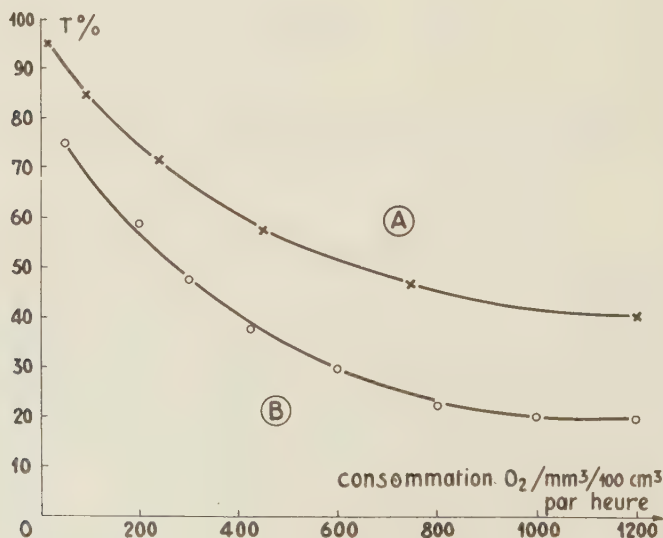


Fig. 29 - Relation entre la transmission et la vitesse de consommation d'oxygène après addition de fer à :
A - Solution S ; B - Solution C.

Le fait que les courbes A et B ne soient pas confondues explique la différence observée dans les valeurs du rapport traduisant l'exaltation de l'effet catalytique du fer en présence de complexon III, selon qu'on évalue d'après la technique manométrique ou colorimétrique ; égal à 400 dans le premier cas, il atteint 550 dans le second.

3/ La comparaison des figures 17 A et 29 A montre que pour les plus faibles quantités de catalyseurs ($T \% > 60 \%$) une même vitesse d'oxydation entraîne l'apparition d'une même quantité de BM.

Quand les transmissions deviennent inférieures à 60 % ce n'est plus le cas, et pour une même vitesse de consommation d'oxygène, la catalyse par le fer donne une solution moins colorée que la catalyse par le cuivre.

4/ Les courbes 17 B et 29 B, exprimant la relation entre la transmission et la vitesse de consommation d'oxygène, pour des solutions de base additionnées de cuivre + peroxydase (17 B) et de complexon/fer + peroxydase (29 B), sont parfaitement superposables.

Nous reviendrons sur ces questions au cours du dernier chapitre.

ACTION DE L'ARGENT

L'efficacité de l'argent comme catalyseur d'oxydation de $l'AH_2$ n'a été mentionnée que par STROEHECKER et ses collaborateurs (118).

Nous avons remarqué que l'addition de quelques μg d'argent (NO_3Ag MERCK) à 5 cm^3 de solution S aérée fait très rapidement baisser la transmission ; puis celle-ci remonte jusqu'à un palier à peu près stable inférieur à celui de départ.

A - VERIFICATION DE L'ACTIVITE DE L'ARGENT

L'expérience suivante prouve de façon indiscutable que l'oxydation catalytique de la solution ascorbique additionnée d'argent n'a pas pour origine une contamination par du cuivre ou du fer.

On ajoute 10 μg d'argent à 5 cm^3 de solution C (Solution de base habituelle renfermant 100 mg d'EDTA par litre). La solution se colore autant qu'après addition d'une même dose d'argent à un même volume de solution S.

Nous concluons :

1/ Cette oxydation ne peut être due à des ions cuivre car nous savons que ce métal forme avec l'EDTA un complexe dépourvu d'activité catalytique.

2/ Cette oxydation ne peut être due à des ions fer, car l'effet catalytique de ces ions serait considérablement accru en présence de complexon III ; ce n'est pas le cas puisqu'une certaine dose d'argent libère la même quantité de BM que ce métal soit ajouté à un même volume de solution S ou C.

En outre, l'addition de GSH à une solution C contenant de l'argent supprime l'activité de cet ion. Le fer étant insensible à la présence de GSH on est ainsi certain de la non contamination du sel d'argent par le fer.

Ces expériences nous permettent donc d'affirmer que l'argent est un catalyseur d'oxydation des solutions d' AH_2 . Cette activité catalytique est inhibée par le GSH, avec lequel l'argent forme un complexe inactif, mais n'est aucunement perturbée par la présence de complexon III. Ce résultat est en accord avec les valeurs données par FLASCHKA (32) tableau X) qui montrent que l'argent ne peut se fixer sur le complexon III à pH : 4.

B - VARIATION AU COURS DU TEMPS DE LA COLORATION DE SOLUTIONS ADDITIONNEES D'ARGENT

La figure 30, traduit les variations de transmission après addition d'argent à la solution de base.

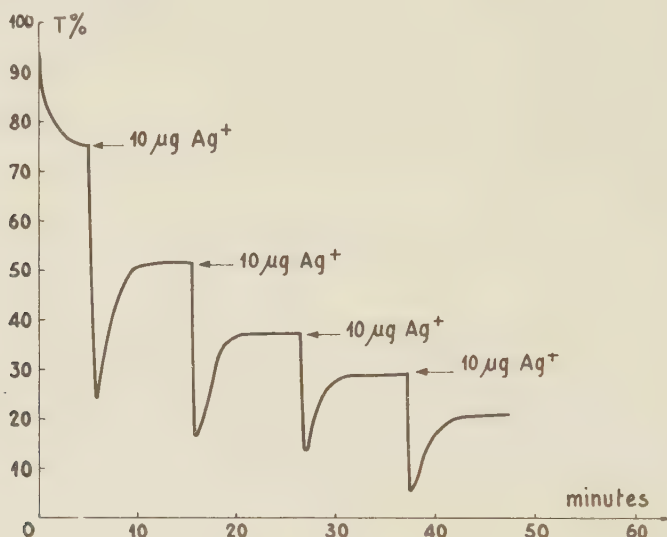


Fig.30 - Variation de la transmission donnée par 5 cm³ de solution C après additions successives d'argent.

Nous avons constaté que :

1/ La longueur de la pointe causée par la coloration passagère de la solution après addition de sel d'argent est fonction de la quantité d'argent ajouté.

2/ La transmission du palier diminue quand la concentration de l'argent croît ; cela permet d'envisager un dosage de ce cation pour des concentrations comprises entre 1 et 50 µg de métal dans 5 cm³ de solution ascorbique.

La pointe observée sur la courbe d'enregistrement après addition de l'argent apparaît de façon constante même dans le cas de plusieurs additions successives ou si la solution de base contient de la peroxydase. Le phénomène n'est donc pas provoqué par la décomposition de l' H_2O_2 sous l'influence de l'argent, comme c'était le cas dans certaines oxydations par le fer.

L'allure des courbes de la figure 30 peut s'interpréter ainsi. Dès leur addition à la solution de base, les ions Ag^+ sont immédiatement réduits à l'état métallique. La réduction des sels d'argent par l' AH_2 a été mise en évidence par STATHIS (115). Ceci est en accord avec les valeurs des potentiels redox à pH = 0 et t = 25° C -

$$\text{Ag}/\text{Ag}^+ = +800 \text{ mv}, \text{AH}_2/\text{A} = +390 \text{ mv}.$$

L'argent métallique initialement colloïdal se groupe en micelles qui flocculent en agregats facilement visibles à l'oeil nu, et donnent à la solution un aspect trouble ; les plus grosses particules précipitent au fond de la cuve. Seule une faible partie de l'argent introduit peut continuer à transporter des électrons ; cette activité résiduelle est à l'origine du palier de coloration correspondant à une concentration en BM très inférieure à celle observée lors de la réduction immédiate de tous les ions Ag^+ par la solution ascorbique au moment de leur addition.

C - COURBES DE SENSIBILITE A L'ARGENT

La courbe de la figure 31 donne en transmission les valeurs des colorations d'équilibre de 5 cm³ de solution C en fonction de la quantité d'argent ajouté.

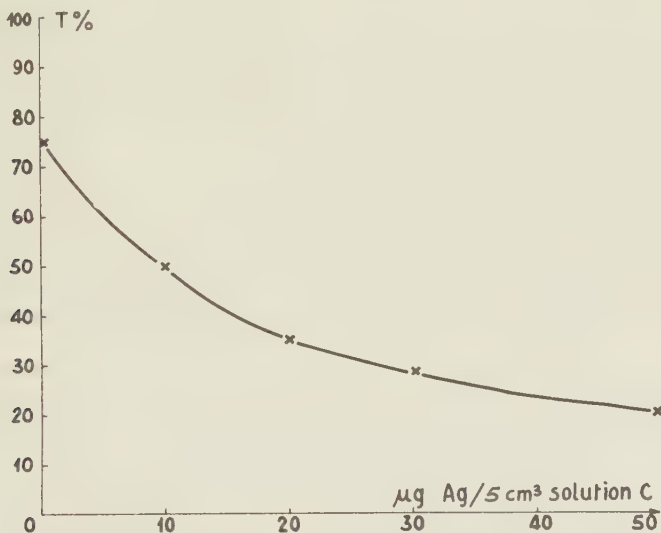


Fig. 31 - Sensibilité à l'argent de la solution C.

Nous avons utilisé une solution contenant du complexon afin d'être assurés de la non perturbation de nos mesures par la présence d'éventuelles traces de cuivre.

La solution ascorbique est relativement sensible puisque 0,3 μg d'argent font, à l'origine, baisser la transmission de 1 %. Bien que la courbe de la figure 31 soit reproductible, cette méthode ne semble pas devoir être retenue pour un dosage de l'argent à cause de la précipitation partielle du métal.

ACTION DE QUELQUES AUTRES CATIONS

L'influence catalytique d'autres cations sur l'oxydation de l' AH_2 a fait l'objet de recherches dont les résultats sont assez contradictoires.

Signalons à titre d'exemple que pour SCHLEMMER et COLOMAN [1932] (108), SUSUMA NAKAMURA et KEIICHI HEMMI [1943] (91) l'aluminium est un catalyseur de l'oxydation de l' AH_2 , alors que d'après G. REIF [1941] (105) G. BRAGAGNOLO [1941] (9) et C. PIANA [1951] (103) il n'a aucune action.

Les résultats sont également contradictoires en ce qui concerne l'action du cobalt (9) (4), du chrome (50) (108) (9), du mercure (118) (9), du magnésium (105) (9) (88) (91), de l'étain (105) (17) (108) (9) (118) et du zinc (105) (96) (118). En revanche le manganèse (111) (105) (95) (9) (4) et le nickel (105) (50) (108) (9) (4) sont considérés à l'unanimité comme capables de catalyser l'oxydation de l' AH_2 .

Pour l'étude de l'activité catalytique de ces différents cations, nous avons procédé comme pour les métaux précédents :

- addition de quelques μg ou fractions de μg de l'ion étudié à 5 cm^3 de solution S aérée. Si la solution se colore de façon permanente, cette coloration traduit une oxydation de l' AH_2 .

Ainsi l'addition de 20 μg de nickel (nitrate de nickel MERCK) à 5 cm^3 de solution S fait baisser la transmission aux environs de 60 %. Après addition d'1 μg de GSH la transmission remonte à 75 %. Il est donc probable que cette oxydation était provoquée par des traces de cuivre, car 1 μg de GSH n'aurait pu inhiber l'activité de 10 μg de nickel. (Masse moléculaire GSH = 307, Masse atomique Ni = 58,7).

Pour vérifier cette contamination du nickel par le cuivre nous avons purifié le sel de nickel par la dithizone.

Comme le prouve le tableau VII extrait du travail de IVANTSCHEFF (62), le cuivre a plus facilement tendance à former un dithizonate que la plupart des autres métaux. Ces constantes de stabilité sont valables lorsque le solvant de la dithizone est du tétrachlorure de carbone.

Tableau IX

Constante de stabilité des dithizonates métalliques (solvant :
tétrachlorure de carbone)
(extrait d'un travail d'Ivantscheff (62)).

ION	K (CCl_4)	$K = \frac{[\text{M}(\text{HD}_2)_{n/o}] [(\text{H}^+)_{aq}^n]}{[\text{M}^{n+}_{aq}] [(\text{H}_2\text{D}_2)_{aq}^n]}$
Ag ⁺	4. 10 ⁷	
Hg ²⁺	5, 7. 10 ²⁶	
Cu ²⁺	10 ¹⁰	
Zn ²⁺	10 ²	
Co ²⁺	12	
Pb ²⁺	0, 12	
Ni ²⁺	0, 064	

H_2D_2 = dithizone
M = métal
o = phase organique
aq = phase aqueuse

L'affinité de la dithizone pour le cuivre a d'ailleurs souvent été utilisée pour le dosage de ce métal (75) (31) (136). La dithizone et les dithizonates métalliques sont insolubles dans l'eau mais solubles dans le tétrachlorure de carbone ou le chloroforme.

Pour effectuer la purification du sel de nickel, nous agitions énergiquement pendant quelques minutes 10 cm^3 d'une solution de dithizone dans du tétrachlorure de carbone (solution à 1 mg de dithizone dans 100 cm^3 de CCl_4 redistillé) avec 20 cm^3 d'une solution aqueuse de nitrate de nickel (10 mg de Ni dans 100 cm^3 d'eau bidistillée.)

Le cuivre présent dans la phase aqueuse va se fixer sur la dithizone, passant ainsi dans la phase organique, dont la couleur vire du vert au rosé.

Nous poursuivons la purification de la solution de nickel par une nouvelle extraction avec 10 cm³ de solution fraîche de dithizone. La phase organique vire du vert au gris rosé.

La dithizone qui serait passée dans la phase aqueuse est extraite par plusieurs lavages au tétrachlorure de carbone redistillé.

L'addition de quelques dizaine de µg de nickel ainsi purifiées, à une solution S aérée n'entraîne aucune libération de BM. Nous pouvons affirmer que cet ion métallique n'a pas d'effet catalytique sur l'oxydation des solutions d'AH₂ contenant du BM.

Il est vraisemblable que des traces de nickel sont passées dans la phase organique mais la concentration en sel de nickel de la phase aqueuse n'a pu en être que très peu affectée car nous avons travaillé avec une concentration moléculaire 50 fois plus élevée en nickel qu'en dithizone. En consultant le tableau IX on peut d'ailleurs constater que le complexe dithizone nickel est très peu stable.

On s'est assuré, de l'absence de dithizone dans la solution de nickel ainsi traitée en vérifiant que la sensibilité au cuivre de la solution de base n'est pas affectée par la présence de quelques gouttes de cette préparation.

Des expériences semblables effectuées sur un certain nombre d'autres cations, nous permettent d'affirmer que dans les conditions expérimentales décrites : l'aluminium, le cobalt, le chrome, le mercure, le magnésium, le manganèse, le nickel, le plomb, l'étain et le zinc n'ont aucune action sur l'oxydation de la vitamine C.

INFLUENCE DE LA PRESENCE D'AUTRES CATIONS SUR LES MICRODOSAGES DE CUIVRE & DE FER

I - MICRODOSAGE DU CUIVRE

La technique de microdosage du cuivre précédemment mise au point, peut-être effectuée sans difficulté dans des solutions minérales contenant : de l'aluminium, du cobalt, du chrome, du mercure, du magnésium, du manganèse, du nickel, du plomb, de l'étain et du zinc, même si ces métaux sont en très grand excès par rapport au cuivre.

En revanche, la présence de fer et d'argent, cations capables d'entraîner l'oxydation des solutions de base peuvent fausser le microdosage du cuivre. Nous n'avons malheureusement pas trouvé de substances capables d'inhiber l'action du fer et de l'argent sans perturber l'oxydation catalysée par le cuivre.

On doit cependant noter que pour faire abaisser la transmission de 1 % (pour les transmissions les plus fortes) il faut : 0,3 µg d'argent, 10 µg de fer et seulement 0,0003 µg de cuivre. Le cuivre semble donc pouvoir être dosé dans une solution minérale même en présence d'un excès raisonnable de fer et d'argent.

En fait, la présence de fer en quantité suffisante modifie le microdosage du cuivre, l'eau oxygénée formée pendant l'oxydation ne s'accumule pas mais participe alors à l'oxydation de la solution.

II - MICRODOSAGE DE FER EN PRESENCE D'EDTA

Pour doser le fer de façon plus précise, on a utilisé ⁽¹⁵⁾ le haut pouvoir catalytique du complexe EDTA-Fe qui entraîne une oxydation environ 500 fois plus rapide que l'ion métallique libre. L'EDTA a en outre l'avantage d'inhiber le cuivre éventuellement présent.

Les complexons ont la propriété de former avec tous les métaux des complexes dont la stabilité dépend de la nature du cation, et de la valeur du pH. On conçoit aisément que la présence de métaux, dont le complexe avec l'EDTA a une constante de stabilité plus élevée que celle du Fe - EDTA, puisse perturber dans certains cas l'activité catalytique de ce dernier.

En effet, à condition qu'il n'y ait pas de complexon libre en excès, le métal étranger déplace le fer pour s'associer à l'EDTA ; le fer, libéré de son complexe, est un catalyseur d'oxydation considérablement moins actif, ce qui entraîne une très forte diminution de la vitesse d'oxydation de la solution étudiée.

Nous avons donc recherché les cations qui, dans nos conditions expérimentales, forment avec l'EDTA des complexes plus stables que celui du fer.

Pour cela, à 5 cm³ de solution S aérée, nous ajoutons 0,1 µg de fer ; sa coloration n'en est pas perturbée car cette concentration en ions libres est trop faible pour entraîner une oxydation sensible de la solution. A l'addition de 5 µg de complexon III, la transmission baisse jusqu'à 50 % environ par formation du complexe Fe - EDTA, 1 µg d'étain à l'état stanneux décolore partiellement cette solution, l'addition d'un deuxième µg la décolore presque totalement. L'étain s'est fixé sur le complexon libérant ainsi les ions fer. Cet essai est représenté par la courbe A de la figure 32.

Des expériences identiques réalisées avec différents cations nous ont permis de vérifier que l'aluminium, le cobalt, le zinc, le plomb, le nickel forment avec l'EDTA des complexes plus stables que le fer. Il en résulte que leur présence perturberait le microdosage du fer, fondé sur le haut pouvoir catalytique du complexe Fe - EDTA, s'il n'y avait pas excès de complexon.

En fait les solutions C préconisées pour le microdosage du fer contiennent 150 mg de complexon par litre, et comme la quantité maxima de fer compatible avec le dosage est de 200 µg par litre, la solution C contient 200 fois la quantité d'EDTA nécessaire pour complexer le fer.

Comme l'indique le tableau X les observations faites au cours de ce travail sur la stabilité relative des différents complexes métalliques de l'EDTA sont en accord avec les valeurs des constantes de stabilité données par FLASCHKA (32).

Remarques :

A - On pourrait envisager un microdosage de l'aluminium, du cobalt

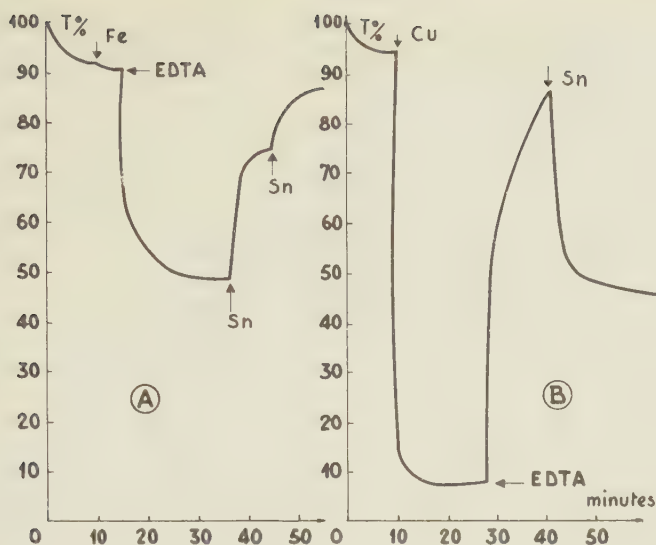


Fig.32 - A - Action de l'étain sur une solution S additionnée de fer et de complexe III ; B - Action de l'étain sur une solution S additionnée de cuivre et de complexe III.

du zinc, du plomb, du nickel, fondé sur l'intensité de la décoloration après addition de ces ions à une solution d'acide ascorbique et bleu de méthylène oxydée catalytiquement par le complexe Fe - EDTA (à condition qu'il n'y ait pas excès de complexe dans les solutions). La mise au point de ces microdosages nous a semblé d'un intérêt moindre étant donné le manque de spécificité de ces réactions.

Tableau X

Constante de stabilité des différents complexes métalliques avec l'E.D.T.A.
(valeurs données par Flaschka (32))

à pH = 4		$\text{Log } K_{(\text{pH}=4)} = \text{Log } K_{(\text{pH}=7)} - 9$				
Métaux	Ag^+	Ba^{++}	Sr^{++}	Mg^{++}	Ca^{++}	Mn^{++}
$\text{Log } K_{\text{pH}=7}$	7,3	7,76	8,63	8,69	10,7	13,79
Métaux	Fe^{++}	Al^{+++}	Co^{++}	Cd^{++}	Zn^{++}	Pb^{++}
$\text{Log } K_{\text{pH}=7}$	14,33	16,1	16,31	16,46	16,5	18
Métaux	Ni^{++}	Cu^{++}	Hg^{++}	Cr^{+++}	Fe^{+++}	
$\text{Log } K_{\text{pH}=7}$	18,6	18,8	21,8	23	25,1	

B - L'addition d'une substance à une solution S peut donc provoquer l'oxydation de la solution, non pas grâce à l'activité catalytique propre de cette substance, mais en démasquant des ions cuivre fixés à certains inhibiteurs présents dans la solution. C'est peut-être à des réactions de ce type que sont dues les incohérences rencontrées dans la littérature.

Il est donc indispensable de connaître exactement la composition du milieu réactionnel avant d'attribuer à une substance une action catalytique sur l'oxydation de l'acide ascorbique.

L'expérience suivante illustre cette remarque :

5 cm³ de solution S sont additionnées de 0,04 µg de cuivre. La transmission tombe à 7 %. L'addition de 1,5 µg d'EDTA inhibe en grande partie cette oxydation ; la coloration faiblit, T % = 80 %. L'addition de 0,5 µg d'étain fait à nouveau baisser la transmission jusqu'à 50 %. La courbe B de la figure 32 traduit ces résultats.

On pourrait conclure en attribuant à l'étain une activité catalytique sur l'oxydation de l'acide ascorbique. Or il n'en est rien : l'étain qui forme avec l'EDTA un complexe plus stable que le cuivre a déplacé celui-ci de son complexe (25). Les ions cuivre ainsi libérés ont entraîné l'oxydation de la solution.

Une expérience semblable a pu être effectuée avec du mercure. Nous avons été surpris de constater que le chrome, qui d'après les valeurs données par FLASCHKA (tableau X) forme avec le complexon III un complexe plus stable que le cuivre, est incapable de déplacer ce dernier de son complexe avec l'EDTA.

III - POSSIBILITE D'UN MICRODOSAGE SELECTIF DES CATALYSEURS MINERAUX DE L'OXYDATION DE L'AH₂

Seuls le cuivre, le fer et l'argent peuvent catalyser l'oxydation des solutions d'acide ascorbique par l'oxygène de l'air.

Il est intéressant de préciser que grâce à l'action de certains inhibiteurs spécifiques de l'activité oxydante de ces métaux, il est possible de définir la nature des catalyseurs présents,
à pH : 4,1.

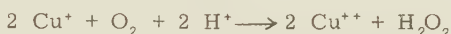
Le complexon III : inhibe l'activité du cuivre accroit considérablement l'activité du fer est sans action sur l'argent.

Le glutathion réduit : inhibe l'activité du cuivre est sans action sur le fer inhibe l'activité de l'argent.

CHAPITRE IV

FORMATION ET ACCUMULATION D'EAU OXYGÉNÉE AU COURS DE L'OXYDATION CATALYTIQUE DE L'AH₂

BARRON et ses collaborateurs (4) ont postulé la formation d'eau oxygénée au cours de l'oxydation de l'AH₂ en présence de cuivre, précisant qu'elle apparaissait lors de l'oxydation des ions cuivreux par l'oxygène moléculaire, et qu'elle se décomposait spontanément en eau et oxygène.



La formation d'H₂O₂ par oxydation d'une solution de sels cuivreux a été signalée dès 1882 par TRAUBE (126).

Au cours de l'étude bibliographique, nous avons noté que divers auteurs s'étaient attachés à mettre en évidence l'apparition de ce peroxyde lors de l'oxydation catalytique de l'AH₂, mais que les résultats positifs obtenus pouvaient convenir à toute substance peroxydique. La présence d'AH₂ en excès constitue une difficulté pour cette recherche, car les propriétés réductrices de la vitamine C interfèrent avec les propriétés oxydantes d'H₂O₂, de sorte que l'extraction du peroxyde constitue en général la première étape de la détection.

En ce qui concerne la destinée de l'eau oxygénée précisons que SZENT-GYORGYI (119), TAUBER (123) SCHUMMER (109) ont mentionné l'augmentation de la vitesse d'oxydation d'une solution ascorbique par addition d'H₂O₂. Mais DAWSON (20), DEKKER et DICKINSON (22) ont indiqué qu'AH₂ pouvait rester stable même en présence d'une concentration 10 fois supérieure en H₂O₂. En effet, d'après PECHERER (100) l'H₂O₂ n'est pas décomposée en présence d'AH₂ s'il n'y a pas de traces de métaux lourds dans le milieu. DEKKER et DICKINSON ont émis l'hypothèse que le cuivre pouvait catalyser la décomposition du peroxyde d'hydrogène.

Notre travail sur l'oxydation de l'AH₂ par l'oxygène moléculaire en présence de BM, fournit une démonstration très simple et remarquable de la formation d'H₂O₂ au cours de cette réaction, et permet d'étudier le comportement de ce peroxyde suivant le catalyseur présent, ceci sans avoir recours à des techniques d'extraction plus ou moins justifiables.

En effet, dans les paragraphes précédents, nous avons eu l'occasion de constater que l'addition de fer, à la solution de base aérée contenant du cuivre était suivie d'une importante libération de BM., due à la destruction de l'H₂O₂ présente ; ce fait est la preuve, d'une part de l'accumulation d'H₂O₂ au cours de l'oxydation de l'AH₂ en présence de cuivre, d'autre part de la possibilité pour le fer de provoquer l'oxydation de la solution ascorbique aux

dépens d' H_2O_2 : c'est ce que nous avons appelé le pouvoir peroxydasique du fer.

Nous nous sommes proposés d'étudier la formation, l'accumulation et l'utilisation d' H_2O_2 au cours de l'oxydation catalytique de solutions de base en fonction de la nature et de la concentration des catalyseurs. Notre technique d'étude repose sur la mesure du BM libéré après action d'un catalyseur peroxydasique sur l' H_2O_2 présente dans l'essai.

Nous avons utilisé la peroxydase (Horse Radish Peroxydase Sigma Chemicals U.S.A. à 60 unités de purpurogalline par mg). Cet enzyme présente la propriété remarquable d'entraîner spécifiquement la décomposition rapide de l' H_2O_2 dans les conditions de la technique colorimétrique ($\text{pH} = 4,1$) en transférant l'oxygène activé de l' H_2O_2 par priorité sur le BMH_2 , sans être douée lui-même de propriétés oxydasiques vis à vis du BMH_2 et de l' AH_2 . La concentration utilisée ($10\text{ }\mu\text{g}$ pour 5 cm^3 de solution) a été définie expérimentalement [fig.3 de (16)]. La solution de peroxydase se conserve facilement sans aucune précaution particulière à la température du laboratoire et sans baisse d'activité décelable pendant plus de 15 jours.

I - FORMATION ET ACCUMULATION D' H_2O_2 AU COURS DE L'OXYDATION DE LA SOLUTION DE BASE PAR LE CUIVRE-POUVOIR PEROXYDASIQUE DU CUIVRE

Expérience : A 5 cm^3 de solution S additionnée de $0,01\text{ }\mu\text{g}$ de cuivre, nous ajoutons 3 minutes après le début de la catalyse, $10\text{ }\mu\text{g}$ de peroxydase ; la transmission baisse immédiatement de 71 % à 35 % puis remonte progressivement et tend vers un palier voisin de 65 % (courbe a de la fig.33)

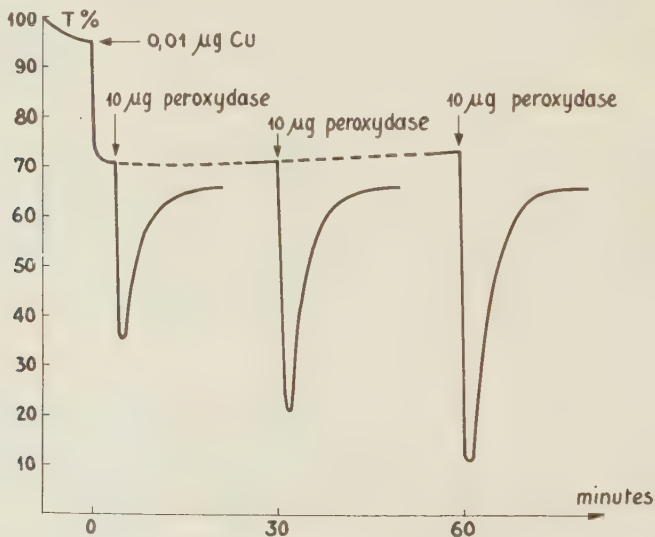


Fig.33 - Action de $10\text{ }\mu\text{g}$ de peroxydase sur 5 cm^3 de solution S additionnée de $0,01\text{ }\mu\text{g}$ de cuivre.

Nous avons repris cette expérience en ajoutant les $10\text{ }\mu\text{g}$ de peroxydase 30 minutes puis 60 minutes après le début de l'oxydation des 5 cm^3 de solution en présence de $0,01\text{ }\mu\text{g}$ de cuivre. Les courbes obtenues sont rassemblées sur la figure 33.

Nous pouvons interpréter ces courbes de la façon suivante :

A l'addition de peroxydase, l' H_2O_2 présente dans l'essai est immédiatement utilisée à l'oxydation de la solution, phénomène qui se traduit par une libération de BM. La quantité d' H_2O_2 présente dans le milieu diminuant très rapidement après l'addition de la peroxydase, la vitesse de formation du BM devient bientôt inférieure à sa vitesse de réduction et on observe après un minimum de transmission une décoloration de la solution jusqu'à un nouveau palier, inférieur à celui de départ (figure 33). En effet, en présence de peroxydase l' H_2O_2 est utilisée dès sa formation à l'oxydation de la solution, entraînant des concentrations de BM à l'équilibre plus élevées qu'en l'absence de peroxydase. (voir fig. 13 courbes A et B).

En considérant les courbes de la figure 33, nous constatons que la différence de concentration en BM entre les valeurs du minimum de transmission et celle du palier de départ, que nous avons appelé BM_{max} est d'autant plus élevé que la peroxydase a été ajoutée plus tard après le début de la catalyse. On en conclut que la concentration en H_2O_2 augmente avec la durée de l'oxydation catalytique.

Ce phénomène méritait d'être étudié plus en détail. Nous avons donc poursuivi ces recherches en mesurant, pour des doses de cuivre croissantes, l'accumulation d' H_2O_2 en fonction du temps. Nous nous sommes rapidement aperçus que les concentrations en H_2O_2 devenaient si fortes qu'au moment de l'addition de peroxydase, les transmissions tombaient à quelques %, c'est-à-dire dans un domaine où les mesures n'ont plus aucune précision. Nous avons alors déterminé les concentrations d' H_2O_2 accumulées dans la solution ascorbique au cours de son oxydation catalytique en mesurant la quantité d' H_2O_2 contenue dans une partie aliquote (1 à 5 gouttes) que l'on porte à l'instant choisi dans la cuve du photolorimètre qui contient :

- 5 cm^3 de solution S aérée additionnée
- de 50 μg de GSH pour inhiber l'activité du Cu
- de 20 μg de peroxydase.

Les quantités de BM libéré après addition de l'échantillon à la cuve de mesure sont traduites en concentration d' H_2O_2 d'après une courbe d'étalonnage obtenue dans des conditions identiques avec des doses connues d' H_2O_2 fig.[4 de (16)].

Les courbes de la figure 34 nous permettent de constater que :

1/ Au cours de l'oxydation catalytique de la solution S par les ions cuivre, l'eau oxygénée formée s'accumule partiellement dans le milieu jusqu'à une concentration limite pour laquelle sa vitesse d'utilisation est égale à sa vitesse de formation ; ce phénomène se traduit par un palier sur les courbes de la figure 34.

2/ La concentration limite en H_2O_2 est fonction de la quantité de cuivre présent.

Les quantités d'eau oxygénée qui s'accumulent au cours de ces réactions peuvent être très élevées comme l'indique la figure 35 ; la courbe renseigne sur la concentration maximum en H_2O_2 qui peut s'accumuler dans 100 cm^3 de la solution S en fonction de la quantité de cuivre présent. Nous avons calculé que lorsque 100 cm^3 de solution S s'oxydent sous l'action de 8 μg de cuivre, la concentration maximum en H_2O_2 après 3 à 4 heures d'oxydation, atteint la valeur de 10,6 mg/100 cm^3 .

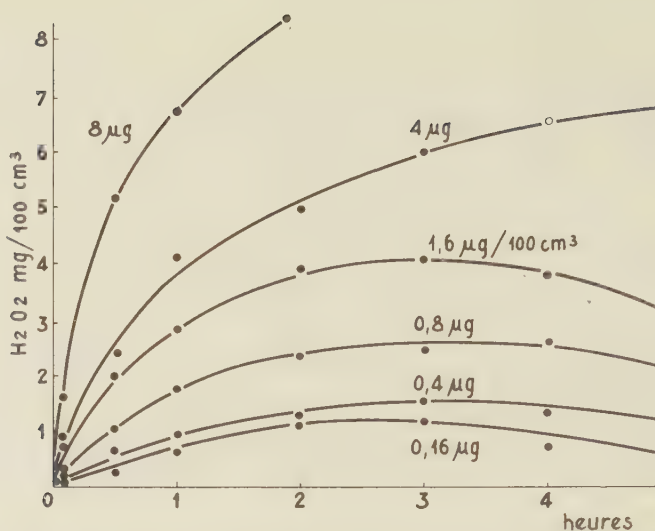


Fig. 34 - Concentration en H_2O_2 accumulée dans 100 cm^3 de solution S oxydée pendant des temps croissants, en présence de doses variables de cuivre.

Remarques :

1/ Au cours des expériences précédentes, nous avons été surpris par les faits suivants :

a) la participation de l'eau oxygénée à l'oxydation des solutions ne cessant de croître au cours de la catalyse, on devrait observer sur les courbes d'enregistrement, une augmentation progressive de coloration. On avait rencontré ce phénomène dans le cas d'une oxydation en présence de Fe - EDTA (15).

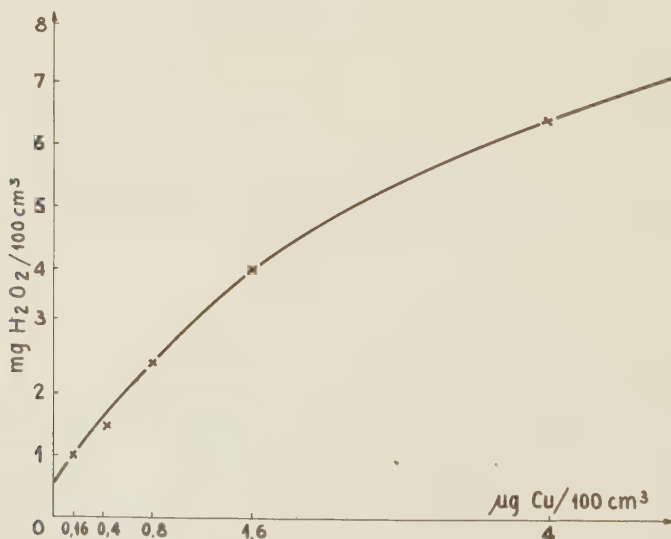


Fig. 35 - Concentration maximum en H_2O_2 accumulée dans 100 cm^3 de solution S en fonction de la quantité de cuivre présent.

b) en considérant les courbes de la figure 34 on constate que la concentration en H_2O_2 passe par un maximum.

Ces anomalies proviennent de la lente fixation des ions cuivre sur les inhibiteurs contenus dans la solution de base.

- 1 par l'oxygène, avec le cuivre comme catalyseur oxydasique,
- 2 par l' H_2O_2 avec le cuivre comme catalyseur peroxydasique.

Au cours de la catalyse, la quantité de BM formé pendant la phase oxydasique tend à diminuer par suite de l'inhibition progressive de l'activité catalytique du cuivre (chap. II parag. III F.) alors que le BM formé aux dépens de l' H_2O_2 croît avec l'augmentation de concentration en peroxyde.

Nous observons en définitive une lente décoloration des solutions ; cela indique que la diminution de la quantité de BM oxydé due à l'inhibition de l'action du cuivre, l'emporte sur l'augmentation de la quantité de BM oxydé lorsque la concentration en H_2O_2 augmente.

La baisse lente de la concentration d'équilibre en H_2O_2 s'interprète par une diminution progressive de la vitesse d'oxydation.

2/ Microdosage du cuivre en présence de peroxydase.

La présence de peroxydase, dans une solution de base contenant du cuivre, permet la décomposition immédiate de l' H_2O_2 formée par oxydation. Au lieu de s'accumuler l' H_2O_2 est ainsi utilisée à l'oxydation de la solution ; il s'en suit une concentration instantanée en BM plus élevée ; la sensibilité apparente de notre réaction colorée en est accrue comme nous pouvons le constater en comparant les courbes A et B de la figure 13.

Afin d'améliorer la sensibilité du microdosage colorimétrique des ions cuivre, il sera donc préférable d'additionner le métal à une solution de base contenant de la peroxydase. La coloration de départ est alors légèrement plus forte qu'en l'absence de peroxydase mais il est particulièrement intéressant d'insister sur le fait que la présence de peroxydase n'a aucune incidence sur la vitesse d'absorption de l'oxygène mesurée par la méthode manométrique.

II - FORMATION ET ACCUMULATION D' H_2O_2 AU COURS DE L'OXYDATION CATALYTIQUE DE LA SOLUTION DE BASE PAR LE FER - POUVOIR PEROXYDASIQUE DU FER

Dans le chapitre précédent (chap. III parag. II), nous avons établi que 28 μg de fer décomposaient l' H_2O_2 accumulée au cours de l'oxydation de la solution de base aérée en présence de cuivre.

Il a été mis en évidence (16) que la décomposition de l' H_2O_2 n'était pas totale et que la quantité résiduelle était fonction de la concentration du catalyseur peroxydasique. Les concentrations maxima en H_2O_2 atteintes au cours de l'oxydation des solutions de base en présence de fer, ont été déterminées ainsi :

5 cm^3 de la solution de base sont additionnés de 50 μg de GSH, pour inhiber toute trace de cuivre, puis de doses de fer comprises entre 0 et 28 μg .

Après un certain temps d'oxydation de l'ordre de l'heure pour les plus faibles doses de fer, plus court pour les plus fortes, le contenu de la cuve

est additionné de 10 μg de peroxydase. L'eau oxygénée présente est immédiatement décomposée avec libération de BM puis la transmission revient à la valeur du premier palier. D'après une courbe d'étalonnage, obtenue dans des conditions identiques avec des doses connues d' H_2O_2 , les quantités maxima de BM libéré sont traduites en concentration d' H_2O_2 présentes dans la cuve au moment de l'introduction de la peroxydase.

Ces valeurs ont permis de tracer la courbe de la figure 36.

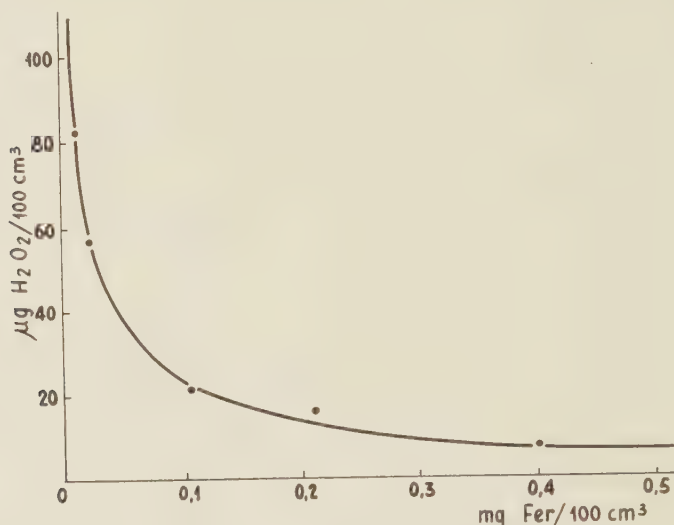


Fig.36 - Concentration maximum en H_2O_2 accumulée dans 100 cm^3 de solution S en fonction de la quantité de fer présent.

Nous constatons que pour les très faibles quantités de fer de l'ordre de 10 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$, la concentration en H_2O_2 est relativement élevée (80 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$) alors que pour des doses de fer plus fortes la concentration en H_2O_2 n'est plus que de 5 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$.

Il a été établi au cours de ces expériences que la concentration maximum en H_2O_2 est rapidement atteinte et reste constante dans le temps.

Remarques :

1/ L'étude de deux phénomènes antagonistes : la formation d' H_2O_2 et sa décomposition, nous permettent de constater qu'un catalyseur peut avoir soit :

a) une activité oxydasique beaucoup plus forte que son activité peroxydasique et de ce fait conduire à des accumulations importantes en H_2O_2 . Il en est ainsi du cuivre.

b) une activité oxydasique relativement faible devant son activité peroxydasique et ainsi ne permettre qu'une concentration d'équilibre en H_2O_2 extrêmement faible ; il en est ainsi pour les ions fer lorsque leur concentration dépasse 100 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$.

Cela ressort nettement de la comparaison des courbes des figures 35 et 36.

2/ Accumulation d' H_2O_2 au cours de l'aération des solutions de base.

Nous avons attribué la lente oxydation des solutions de base en cours d'aération, à l'activité des impuretés de fer apportées par les réactifs. Ces traces de fer évaluées à $0,02 \mu\text{g}$ dans 5 cm^3 font baisser la transmission de la solution de base aérée vers 95 %, et sont la cause d'une absorption d'oxygène de 15 mm^3 par heure pour 100 cm^3 de solution. L'eau oxygénée accumulée au cours de cette lente oxydation n'est que très lentement décomposée en présence de si faibles traces de fer (comme le montre la figure 35). L'accumulation d' H_2O_2 par simple aération de la solution de base est nettement mise en évidence par les courbes de la figure 23, de sorte que la conservation de ces solutions sous azote est loin d'être une précaution superflue.

3/ Synergie fer - cuivre

Quelques auteurs ont signalé l'existence d'une synergie fer cuivre dans la catalyse d'oxydation de l' AH_2 (59) (77) (102). A la lumière des faits que nous venons d'exposer on peut proposer l'explication suivante : Si l'oxydation catalytique de l' AH_2 par les ions cuivre s'effectue en présence de quantités de fer relativement importantes (plus de $10 \mu\text{g}$ pour 100 cm^3) celui-ci joue le rôle de catalyseur peroxydasique. L' H_2O_2 ne s'accumule plus dans le milieu mais est immédiatement utilisé à l'oxydation de la solution.

A vitesse de consommation d'oxygène égale, la concentration en AH_2 diminue un peu plus vite.

Nous n'avons pas jusqu'ici rencontré d'exemple de synergie vraie, mais il n'est pas exclu qu'il puisse en exister dans certains milieux plus complexes et avec d'autres conditions.

4/ Microdosage des peroxydes

L'apparition de BM, après addition d'un peroxyde à la solution de base contenant un catalyseur peroxydasique, est à l'origine d'une technique de la mesure de l'activité de divers peroxydes et de leur dosage. Ces recherches ont fait l'objet d'une récente publication (16), présentant l'étude comparée de l'activité peroxydasique de doses croissantes d'ions fer et de certains de leurs complexes, sur l' H_2O_2 et divers peroxydes organiques. L'utilisation combinée de la peroxydase (catalyseur spécifique de la décomposition de l'eau oxygénée et des peroxydes qui se dédoublent rapidement en H_2O_2) et des complexes de fer, a permis dans certains cas le dosage sélectif de l' H_2O_2 et d'un peroxyde organique.

L'étude théorique de la décomposition de ces peroxydes au sein des solutions de base nous a largement aidés pour l'interprétation des réactions observées au cours de ce travail.

III - ETUDE DE QUELQUES PHENOMENES LIES A LA FORMATION D' H_2O_2

A - RAPPORT ENTRE LA QUANTITE D'OXYGENE ABSORBE ET LA QUANTITE D' AH_2 OXYDE

Nous avons mentionné au cours de l'introduction, que les auteurs qui s'étaient intéressés à l'oxydation de l' AH_2 , avaient constaté que la quantité d'oxygène absorbé était toujours comprise entre 1 et 2 fois celle correspondant à la formation d'acide déhydroascorbique (76) (22) (116) (129).

D'après STEINMANN et DAWSON (116), MAPSON (78), on obtiendrait une fixation rigoureusement égale à 1 atome d'oxygène par molécule d' AH_2 , dans le cas où la catalyse coopère avec le cuivre, ou dans celui où l'oxydation est catalysée par l'acide ascorbique oxydase. D'après ces auteurs, l'oxydation enzymatique ne serait pas accompagnée de formation d' H_2O_2 , résultat cependant contesté par EBIHARA (27).

L'étude approfondie de ce phénomène est actuellement en cours dans les laboratoires de l'Ecole de Brasserie. Nous pouvons cependant, dès à présent, avancer que l'écart observé entre la quantité réelle et la quantité théorique ne peut être totalement expliqué par la formation et l'accumulation de H_2O_2 . Il semble que l'oxygène actif de ce peroxyde puisse entraîner une oxydation plus poussée de l'acide déhydroascorbique (nous avons noté au cours de l'introduction (parag. II C 6) l'impossibilité de retrouver tout l'acide déhydroascorbique provenant de l'oxydation de l' AH_2 mis en oeuvre).

B - LE SYSTEME OXYDANT ACIDE ASCORBIQUE-OXYGENE

L'apparition d' H_2O_2 au cours de l'oxydation catalytique de l' AH_2 permet d'expliquer un phénomène observé par différents auteurs : l'oxydation induite de substances présentes au côté de l' AH_2 lors de son oxydation catalytique (28) (4) (107) (133) (56) (57) (1) (119). Ces oxydations couplées ont été étudiées dans les laboratoires de l'Ecole de Brasserie et ont fait l'objet d'une publication en 1956 (129).

Lors de nos recherches, nous avons eu l'occasion de constater ce pouvoir oxydant des solutions d'acide ascorbique en cours d'oxydation.

Nous avons remarqué que l'acide ascorbique oxydase perd rapidement son activité lorsqu'elle catalyse l'oxydation de l' AH_2 (ch II, parag. I D). Ce fait a déjà été mentionné par certains auteurs (116) (27) (83) qui ont noté que cette baisse d'activité était moindre si l'acide ascorbique oxydase était protégée par de la catalase ou une protéine inerte telle que la gélatine. Il paraît vraisemblable que cet enzyme soit dénaturé par oxydation.

Au cours de l'étude de l'inhibition de l'activité catalytique du cuivre par les dérivés sulfhydrylés (ch. II, parag. 3, A 3^e) nous avons précisé que le pouvoir inhibiteur d'une dose déterminée de glutathion ou de cystéine était moindre lorsque ceux-ci étaient ajoutés à une solution ayant été oxydée pendant un certain temps. Or nous avons vu que le glutathion oxydé (GSSG) ou la cystine sont dépourvus de pouvoir inhibiteur sur la catalyse au cuivre. Le phénomène précédent peut s'expliquer par une oxydation partielle du glutathion ou de la cystéine par l'eau oxygénée présente dans l'essai. Plus il y a d'eau oxygénée, moins l'effet inhibiteur est important.

CHAPITRE V

ÉTUDE DES RÉACTIONS QUI GOUVERNENT LA CONCENTRATION EN BM

Nous étudierons d'abord la réduction du BM par AH_2 . Nous passerons ensuite à sa formation par oxydation du leucobleu :

- 1 - lorsque la catalyse est assurée par les ions cuivre en présence ou non de peroxydase,
- 2 - par les ions fer et ses complexes.

I - REDUCTION DU BLEU DE METHYLENE

A pH 4,1, même à l'obscurité, la réduction du BM par l'acide ascorbique est totale, si la concentration du colorant est faible.



Elle est relativement rapide, puisqu'en 10 minutes, 25 mg de BM sont réduits par une solution d' AH_2 à 4,400 g/l.

Nous allons en premier lieu démontrer que cette réaction est d'ordre 1, puis nous étudierons l'influence de la lumière et des métaux lourds sur la vitesse de la réaction.

A - ORDRE DE LA REACTION

La concentration en acide ascorbique pouvant être considérée comme constante au cours de nos essais, la vitesse de réduction du BM par AH_2 s'écrit :

$$v = \frac{dx}{dt} = - kx$$

Si l'on a affaire à une réaction du premier ordre X représente la concentration instantanée du BM.

La loi de la variation de la concentration en BM en fonction du temps s'écrit :

$$x = x_0 e^{-kt}$$

x_0 désignant la concentration en BM à l'instant initial.

Pour la solution de base, à température constante et sous faible éclaircissement, on peut vérifier que k est bien une constante. On détermine k expérimentalement en étudiant la courbe de décoloration d'une goutte de solution de BM à 1 pour 1000 ajoutée à la solution de base saturée d'air et sans addition de cuivre. En se référant à la courbe d'étalonnage au BM (fig.4) on note les concentrations en BM de la solution à des temps donnés. Le temps zéro est pris au moment où la concentration en BM est maximum.

Le coefficient k est donné par la formule

$$k = \frac{1}{t} \log \frac{x_0}{x}$$

Les résultats sont transcrits dans le tableau XI.

Tableau XI

Calcul de K pour différentes transmissions

T %	t en min.	B M mg/100 cm ³	$\frac{X_0}{X_t}$	K_{0-t} min ⁻¹
35	0	0,572		
44	1,4	0,407	1,35	0,239
55	2,8	0,295	1,94	0,236
62	4,3	0,204	2,80	0,239
72	6,8	0,126	4,54	0,222
80	10,8	0,089	6,42	0,175

La constance du coefficient k est ainsi vérifiée tout au moins au début de la décoloration (pour $T > 70$ %). Pour les colorations plus faibles, k diminue, probablement en raison de la présence de traces d'impuretés colorées dans BM, plus lentement réductibles que lui.

B - INFLUENCE DE LA LUMIERE

La réduction du BM par l'acide ascorbique est accélérée par la lumière, en conséquence l'augmentation de l'intensité lumineuse affaiblit la coloration d'équilibre d'une solution de base en cours d'oxydation.

D'après STRAUB (117) l'action de la lumière sur la réduction spontanée est liée à un changement de différence de potentiel entre AH_2 et BM. Les longueurs d'onde absorbées par le BM seraient responsables d'une augmentation de son potentiel rédox.

D'après MARTINI et BONSIGNORE (79) la lumière diminue le potentiel rédox des solutions d'acide ascorbique. L'effet est particulièrement sensible en présence de certaines substances photodynamiques dont le BM.

Pour minimiser l'importance de l'effet photochimique et augmenter la sensibilité apparente de notre réaction colorée, nous avons été conduits à travailler sous très faible intensité lumineuse.

Comme nous l'avons constaté au cours de l'étude des complexes du cuivre, de fortes insulations provoquent en outre la photolyse du BMH_2 en donnant naissance à des substances soufrées telles que SH_2 , inhibitrices de l'action catalytique du cuivre.

C - EFFET DU CUIVRE ET DU FER SUR LA REDUCTION DU BM PAR AH_2

En 1938, STRAUB, (117) avait remarqué qu'à des concentrations de l'ordre de M/100, le cuivre augmentait la vitesse de réduction du BM. Nous avons en effet constaté qu'en présence de 10 mg/1, la vitesse de réduction de 25 mg de BM par une solution d' AH_2 à 4,4 g/1 est exactement deux fois plus rapide qu'en son absence. Mais, comme nous travaillons sur des concentrations maxima en cuivre de l'ordre de quelques μg ou dizaines de μg /1, la vitesse de décoloration du BM par AH_2 n'est pas influencée de façon décelable par la présence de ce catalyseur.

STRAUB avait signalé d'autre part que le fer, le nickel, le cobalt et le manganèse n'avaient aucune incidence sur la vitesse de réduction du BM par AH_2 . Nous avons pu vérifier qu'il en est bien ainsi pour le fer, même si ce métal se trouve à des concentrations de l'ordre du gramme par litre.

C'est grâce à la constance du coefficient k dans nos conditions opératoires, c'est-à-dire faibles quantités de cuivre et faible intensité lumineuse, que la concentration d'équilibre que prend le BM dans une solution de base aérée, est directement proportionnelle à la quantité de cuivre présent.

II - FORMATION DU BLEU DE METHYLENE

A - CATALYSE PAR LE CUIVRE

1/ Phase oxydasiq

Les ions cuivriques introduits dans la solution de base peuvent être :

a) soit réduits par l'acide ascorbique, ce qui entraîne une oxydation directe de la vitamine C, échappant à la réaction colorée.

b) soit réduits par le leucoblu de méthylène et dans ce cas, l'oxydation de l' AH_2 se fait par l'intermédiaire du colorant.

Nous espérons pouvoir aisément déterminer la participation de la seconde réaction en mesurant le BM apparu après addition d'une quantité connue d'ions cuivriques à une solution S maintenue sous azote. (Les quantités de cuivre ajoutées doivent être relativement élevées pour que le BM apparaisse en quantité mesurable).

1° Expérience : Nous avons pour cela ajouté quelques μg de cuivre, provenant d'une fraction de cm^3 d'une solution de sulfate de cuivre soigneusement désaérée, à 10 cm^3 de la solution de base exempte d'oxygène. Nous avons été surpris de constater que cela n'entraîne qu'une très faible libération de BM. La transmission baisse vers 95-90 % et se stabilise à cette valeur. Les baisses de transmission sont irrégulières et ne paraissent pas en relation directe avec la quantité de cuivre ajouté. Les quantités de BM libéré sont de l'ordre du μg en présence de doses de cuivre variant entre 1 et 20 μg

2° Expérience : Si les 10 cm^3 de la solution maintenue sous azote contiennent du GSH, la libération de BM est immédiate et beaucoup plus importante à l'addition des ions cuivriques. Le BM apparu est ensuite totalement réduit par AH_2 , et la solution se décolore complètement.

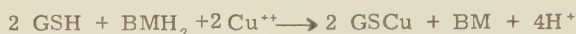
3° Expérience : Si aux 10 cm^3 de solution S maintenue sous azote, et contenant quelques μg de cuivre, (Transmission stable voisine de 90-95 %)

nous ajoutons du glutathion désaéré (50 à 100 μg) BM est instantanément libéré en quantité assez importante, fonction de la concentration en cuivre, puis la transmission remonte à 100 %.

Interprétation : Nous pensons pouvoir interpréter ces faits en avançant qu'à pH 4,1 seule une faible proportion des ions cuivriques est réduite par la solution de base maintenue sous azote.

En effet, si la réduction des ions cuivriques était totale, il se produirait une libération immédiate de BM au moment de leur addition à la solution de base, comme c'est le cas d'un oxydant tel que la quinhedrone, et l'on assisterait ensuite à la réduction progressive et complète du BM par la solution.

Pour qu'il apparaisse du BM au moment de l'addition de GSH dans l'expérience n° 3, il est nécessaire qu'une forte proportion de cuivre soit encore à l'état cuivrique. La libération du BM découle de la réaction :



GSH réduit les ions cuivriques et donne naissance à la combinaison cuivreuse GSCu.

C'est à la formation d'une telle combinaison non oxydable par l'oxygène moléculaire, qu'est due l'inhibition de l'activité oxydasique du cuivre par le glutathion.

On peut en conclure qu'il existe sous azote un état d'équilibre entre les couples AH_2/A , BMH_2/BM , $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{++}$. Le couple AH_2/A , présent en grand excès gouverne les deux autres.

Nous pouvons encore préciser que, même en présence d'un très grand excès d' AH_2 , seule une petite fraction du cuivre ajouté, (celle qui est à l'état cuivreux), peut jouer le rôle de catalyseur oxydasique en présence d'oxygène. En effet, en s'oxydant au contact de l'air $\text{Cu}^+ \longrightarrow \text{Cu}^{++}$, les ions cuivriques formés, tendent rapidement à être réduits par AH_2 et BMH_2 pour que le rapport $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{++}$ reprenne sa valeur initiale.

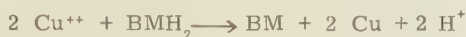
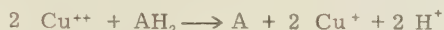
Dans les conditions habituelles de notre réaction colorée où les vitesses d'oxydation sont faibles, la concentration en acide ascorbique peut être considérée comme invariable, ainsi que la proportion du cuivre actif qui en dépend. Mais lorsqu'au cours d'oxydations prolongées, le rapport des concentrations AH_2/A décroît, la fraction du cuivre actif ne cesse de décroître elle aussi, ainsi que la valeur du rapport BMH_2/BM .

Il en résulte qu'après une oxydation suffisante, la solution de base ne se décolore plus complètement si on la ramène sous azote pur. (voir tableau VII).

Le dernier argument ne suffit cependant pas à expliquer pourquoi, après addition de cuivre, la transmission de la solution de base se stabilise aux environs de 90-95 %, valeur pratiquement indépendante de la quantité de cuivre introduite, alors que l'addition de quantités équivalentes d'un autre oxydant (quinhedrone par ex) qui modifie de façon identique le rapport AH_2/A , est toujours suivie d'une décoloration totale de la solution sous azote. Nous pensons pouvoir attribuer cette faible coloration à une très faible oxydation de la solution par les traces d'oxygène amenées par l'azote. Cet azote est très soigneusement purifié ainsi qu'il a été dit, mais il arrive dans la salle de mesure par un tube de polyéthylène de plusieurs mètres de longueur. On peut démontrer par ailleurs la diffusion de l'oxygène à travers le plastique. Si des traces d'oxygène existent alors dans l'azote, elles sont fixées par le cuivre présent à forte concentration dans la solution de base, et l'oxydation qui en résulte peut rendre compte de la faible coloration persistante.

On peut expliquer ainsi la non reproductibilité des résultats de l'expérience n° 1, et en particulier les faibles variations de coloration qui accompagnent les changements de débit de l'azote.

Ainsi, la nature même des phénomènes nous interdit d'évaluer directement l'importance relative de chacune des deux réactions compétitives :



Nous pouvons cependant avoir une idée approximative en considérant la phase peroxydasique.

2/ Phase peroxydasique

a) En l'absence de peroxydase

Comme l'activité peroxydasique du cuivre est très faible devant son activité oxydasique, l'accumulation d' H_2O_2 dans la solution de base est possible jusqu'à des concentrations relativement élevées. Cependant, plus la concentration en H_2O_2 croît, plus l'importance de l'oxydation effectuée à ses dépens augmente jusqu'à ce que sa vitesse d'utilisation soit égale à sa vitesse de formation. Quelle que soit la dose de cuivre utilisée, (dans les limites de nos essais), l'équilibre demande 3 à 4 h pour s'établir (fig. 34). La durée de nos expériences étant généralement inférieure à 1 heure, H_2O_2 n'atteint jamais sa concentration limite et sa participation à la formation du BM reste toujours faible.

Bien que l'eau oxygénée, en présence d'ions cuivreux, ne conduise pas aux mêmes réactions d'oxydation qu'en présence d'ions ferreux, nous pouvons avancer un schéma d'oxydation calqué sur la réaction de Fenton.



Les ions Cu^{++} rentrent dans le circuit précédent.

Quant aux radicaux HO° , ils peuvent non seulement provoquer l'oxydation de AH_2 et de BMH_2 , mais en outre celle de substances organiques même non autoxydables et sont responsables des oxydations couplées.

b) En présence de peroxydase

Aux concentrations où nous l'utilisons habituellement, (20 μg /essai), la peroxydase entraîne une décomposition très rapide de l'eau oxygénée présente dans la solution de base.

Or, il a été calculé que le pourcentage d' H_2O_2 utilisée dans l'oxydation de leucobleu atteignait 92,3 % dans des conditions expérimentales identiques aux nôtres (16). Si donc, l'oxydation de la solution de base sous l'influence du cuivre se fait en présence de peroxydase, cette dernière entraîne la production d'une quantité supplémentaire de BM aux dépens de l'eau oxygénée.

Or, en comparant les courbes A et B de la figure 14, nous constatons que la concentration d'équilibre en BM obtenue par oxydation sous l'effet d'une quantité de cuivre donnée, et pour une même vitesse de fixation d' O_2 , est sensiblement double en présence de peroxydase. Nous sommes donc nécessairement amenés à admettre que, comme au cours d'une oxydation de la solution de base par l'eau oxygénée, la participation du système BMH_2/BM dans la réduction des ions Cu^+ est beaucoup plus importante que celle du système AH_2/A .

Ceci a lieu malgré un rapport $\text{BMH}_2/\text{AH}_2 = \frac{1}{300}$.

B - CATALYSE PAR LE FER

a) Les ions fer libres

1/ Phase oxydasique

Nous avons déjà noté que la baisse de transmission des solutions S consécutive à l'addition d'un sel de fer était la même que le catalyseur, soit à l'état ferreux ou ferrique.

Ce fait nous semblait curieux, car en raison de la quantité relativement élevée de catalyseur ajouté, on s'attendait à une libération immédiate de BM au moment de l'addition du sel ferrique, correspondant à l'oxydation rapide du leucobleu.

Nous avons donc été amenés à penser que, contrairement aux sels cuivriques, les sels ferriques oxydent préférentiellement AH_2 . Les sels ferreux sont ensuite oxydés par l'air avec formation d' H_2O_2 .

2/ Phase peroxydasique

Nous avons constaté qu'aux concentrations de fer utilisées l' H_2O_2 était décomposée dès sa formation selon la réaction de FENTON.



Le radical HO° oxyde préférentiellement le BMH_2 , tandis que les ions ferriques sont surtout réduits par AH_2 .

Le BM apparu au cours de l'oxydation catalytique de la solution de base par le fer provient en grande partie de la phase peroxydasique.

b) Les complexes de fer

Le complexe EDTA-Fer se comporte de façon analogue aux ions cuivre dans la phase oxydasique, mais son activité peroxydasique est plus élevée que celle des ions cuivre.

La courbe A de la figure 37 traduit la similitude des résultats obtenus en présence de peroxydase avec le cuivre et EDTA-Fer.

Pour la représentation schématique des phénomènes, on consultera les tableaux I et II.

La figure 37 donne la relation existant entre la concentration en BM des solutions, et leur vitesse de consommation d'oxygène, suivant la nature des catalyseurs présents.

Nous voyons que pour une même vitesse d'absorption d'oxygène la concentration en BM est :

a) plus élevée en présence de peroxydase car la majeure partie de l'oxygène est utilisée à l'oxydation de la solution avec le BM comme intermédiaire.

b) moindre en présence d'ions cuivre sans peroxydase, car une partie de l'oxygène est immobilisée sous forme de peroxyde d'hydrogène.

c) la plus faible en présence d'ions fer libres car la majeure partie du BM n'apparaît qu'au cours de la phase peroxydasique ; lors de la phase oxydasique les ions ferriques oxydent AH_2 préférentiellement à BMH_2 .

Bien que le chemin suivi par l'oxydation de l' AH_2 soit différent en présence de fer et en présence de cuivre, l'expérience montre que pour les plus

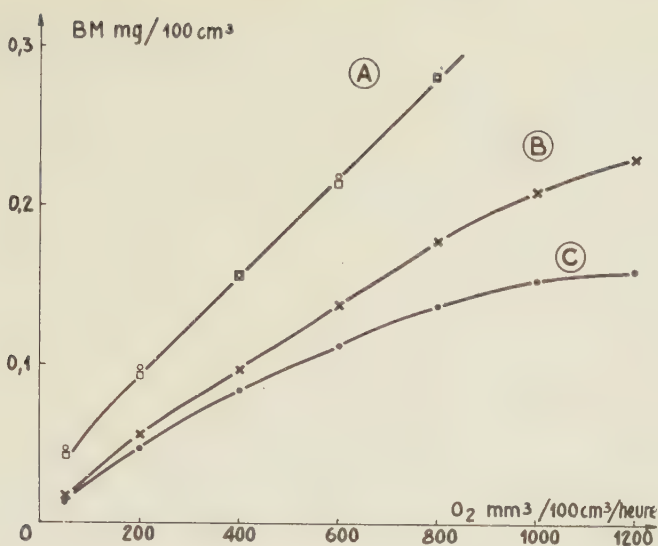


Fig.37 - Rapport entre la concentration en BM et la vitesse d'absorption d'O₂ en présence de :

A - Cu + peroxydase et Fe - EDTA + peroxydase ; B - Cuivre ; C - Fer.

faibles concentrations en catalyseur, les quantités de BM correspondant aux mêmes vitesses d'absorption d'O₂ sont assez voisines. En présence de cuivre la quantité de leucobleu oxydé aux dépens de l'H₂O₂ formée augmentant avec la concentration en cuivre, la courbe B se détache de la courbe C lorsque les quantités de catalyseur augmentent.

CONCLUSIONS

Nous avons exposé notre contribution personnelle à un travail d'équipe réalisé sous la direction de Monsieur CHAPON sur un sujet dont les développements ont jusqu'ici fait l'objet d'une dizaine de publications de chimie pure ou appliquée.

Le thème de ces recherches est l'étude du mécanisme d'oxydation d'une solution d'acide ascorbique. La cinétique du phénomène est rendue accessible par l'addition d'une petite quantité de leucobleu de méthylène. On peut dire en règle générale que tout oxydant ajouté à la solution de base y provoque l'apparition de BM qui est ensuite réduit par l'acide ascorbique. Le BM se comporte ainsi comme un intermédiaire dont le haut pouvoir colorant permet de travailler sur de très faibles quantités de réactifs (de $1/1000 \mu\text{g}$ à quelques μg au maximum).

D'après la nature de l'oxydant, nous pouvons nous trouver devant l'un des cas suivants :

1/ Si l'oxydant réagit rapidement, la concentration en BM subit une brusque augmentation, passe par un maximum aigu puis revient lentement à sa valeur d'origine sous l'action réductrice de l'acide ascorbique. Ce fait trouve son application dans le dosage des peroxydes.

2/ Si l'oxydant réagit lentement, la concentration de BM suit fidèlement la vitesse de réduction de cet oxydant par l'acide ascorbique, toujours présent en grand excès.

3/ Si après avoir été réduit par l'acide ascorbique, l'oxydant peut être réoxydé par l'oxygène moléculaire, on est en présence d'une réaction catalytique que l'on peut suivre colorimétriquement. Quand la concentration de l'oxygène est maintenue constante par barbotage d'air dans la cuve de mesure, le catalyseur oxydasique oscille régulièrement entre ses deux états d'oxydation. Plus le catalyseur est actif, plus l'oxydation est rapide et plus la concentration en BM est grande. Sous faible éclaircissement, le BM apparu n'est réduit que lentement de sorte que sa concentration d'équilibre peut atteindre des valeurs hors de proportion avec la quantité de catalyseur introduit. La sensibilité de la réaction colorée vis à vis du catalyseur est très élevée.

La première partie de notre travail a été spécialement orientée vers l'étude de la catalyse par le cuivre.

Nous avons participé à la mise au point de la technique de préparation des solutions de base. Après avoir mis en évidence que le manque de stabilité et les variations de sensibilité de nos premiers essais étaient dues es-

sentiellement à des inhibiteurs de nature sulfhydrylée, présents à l'origine dans les réactifs ou résultant d'une photolyse du leucobleu de méthylène, nos efforts ont été dirigés vers l'élimination de ces substances parasites.

Nous avons réussi à mettre au point une solution de base stable et une technique de mesure permettant en particulier un microdosage colorimétrique des ions cuivre, dont nous avons reculé la limite de sensibilité jusqu'à $5.10^{-4}/\mu\text{g Cu}$ dans 5 cm^3 .

Nous avons étudié l'action des inhibiteurs du cuivre, en nous attachant spécialement aux substances sulphhydrylées : glutathion, cystéine, diéthyl-dithiocarbamate.

Des mesures manométriques de consommation d'oxygène par la méthode de WARBURG, nous ont permis d'établir le lien entre les résultats de nos mesures colorimétriques et la cinétique d'oxydation des solutions de base.

Dans la seconde partie, nous avons appliqué cette technique colorimétrique à la recherche de l'activité oxydasique d'autres ions métalliques.

L'activité oxydasique du fer, très inférieure à celle du cuivre présente un intérêt restreint. Cependant, l'exaltation de l'activité catalytique du fer en présence d'EDTA a permis de doser ce métal avec une sensibilité atteignant $5.10^{-3}\mu\text{g}/5\text{ cm}^3$.

A côté de leur effet oxydasique, les ions fer possèdent une activité peroxydasique sur l'eau oxygénée et les peroxydes organiques qui a été mise à profit dans un microdosage de ces substances.

L'argent présente une activité oxydasique notable dont on a précisé les caractéristiques : l'effet de cet ion est inhibé par le glutathion, mais, à la différence du cuivre, il n'est pas perturbé par la présence d'EDTA.

L'étain, le plomb, le mercure, l'aluminium, le chrome, le zinc, le manganèse, le nickel, le cobalt, le magnésium, se sont avérés inactifs.

Dans la troisième partie, en nous appuyant sur les travaux d'autres membres de l'équipe, nous avons utilisé le fait que la peroxydase de Raifort présente une activité peroxydasique très élevée et spécifique de H_2O_2 en présence de la solution de base, pour préciser les mécanismes de l'oxydation catalytique de l'acide ascorbique par les ions fer et cuivre. Nous avons ainsi étudié quantitativement la formation d' H_2O_2 sous l'effet de traces de fer et de cuivre.

A la lumière de ces résultats, nous avons proposé un mécanisme réactionnel qui rend compte des particularités essentielles de l'oxydation de la solution de base, mises en évidence au cours de ces recherches.

Les résultats obtenus avec l'acide ascorbique comme substrat oxydable particulier, permettent de mieux comprendre un grand nombre de phénomènes généraux d'oxydation dans lesquels interviennent l'oxygène moléculaire, et des traces de métaux lourds.

Les travaux originaux sur le mécanisme de l'oxydation des bières réalisés à l'aide de la technique colorimétrique dans les laboratoires de Recherche de l'Ecole de Brasserie en sont la meilleure preuve.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ABDERHALDEN E. - Fermentforschung 15 522 (1938).
- 2 - BALAKHOVSKII S.D. - DROZDOVA N.N. - FEDOROVA V.N. Biokhimiya, 18 112-19 (1953).
- 3 - BALL E.G. - J. Biol. Chem. 118 219-39 (1937).
- 4 - BARRON E.S.G. - DE MEIO R.H. - KLEMPERER F. - J. Biol. Chem. 112 625 - 640 (1935-36).
- 5 - BAUMANN Z. - physiol. Chem Hoppe Seyler's 8 299 (1883-84).
- 6 - BHADURY R. - J. Indian - Chem. Soc. 27 297-304 (1950).
- 7 - BONSIGNORE A. - BEVILACQUA L. - Boll. Soc. Ital. biol. Sper. 20 788 - 790 (1945).
- 8 - BORSOOK H. - KEIGHLEY G. - J. Proc. Nat. Acad. Sc. 19 875 (1933).
- 9 - BARGAGNOLO G. - Ann. chim. appl. 31 250-68 (1941).
- 10 - BUNATYAN G.K. - Trudy Vsesoyuz Konf. vitaminan (Moscow June 19-23 (1939) 68-70 (1940).
- 11 - BURGER R.M., BECKER K. - Am. Soc. Brewing Chemists Proc. 78-83 (1951).
- 12 - GALCUTT G. - Experiential 7 26 (1951).
- 13 - CAMPBELL J., TUBB W.G. - Can. J. Research 28 E 19-32 (1950).
- 14 - CHALK A.J., SMITH J.F. - Nature 174 802 (1954).
- 15 - CHAPON L., CHAPON S., URION E. - Bull. soc. chim. de France 856 (1959).
- 16 - Mme CHAPON S., CHAPON L., URION E. - Bull. soc. chim. de France (1960).
- 17 - CHAVES J.M., GUIMARAES L.R. - Rev. quim. ind. (Rio de Janeiro) 13 n° 144 19-21 (1944).
- 18 - CSUROS Z., PETRO J. - Acta. Chim. Acad. Sci. Hung. 7 199 (1955).
- 19 - DAWSON C.R. - MALLETTE - "advances in protein chemistry" - vol. II Academic Press New-York (1945).
- 20 - DAWSON C.R. - "The copper protein ascorbic oxydase" Mc Elroy and Glass editors John hopkins Press Baltimore 1950.

- 21 - DE CARO L., GIANI M. - Z. physiol. Chem. Hoppe-Seyler's 228 13-24 (1934).
- 22 - DEKKER A.O., DICKINSON R.G. - J. Am. Chem. Soc. 62 2165 (1940).
- 23 - DELEPINE - Compt. rend. 146 981-4 (1908).
- 24 - DOBRY A. - Nature 176 266 (1955).
- 25 - DUBSKY J. - Collat. Czèchosl. Chem. communic. 24 12 (1959).
- 26 - DUNN F.J., DAWSON C.R. - J. Biol. Chem. 189 485 (1951).
- 27 - EBIHARA T. - J. Biochem Tokyo 29 199 (1939).
- 28 - EKMAN B. - Act. Physiol. Scand. 8 Suppl. XXII 5 (1944).
- 29 - EULER H.V., MYRBAC K., LARSSON H.O. - Z. physiol. Chem. Hoppe-Seyler's 217 (1933).
- 30 - Mc FARLANE W.D. - Biochem J. 30 1472 - 8 (1936).
- 31 - FISCHER H., LEOPOLDI G. - Angew Chem. 47 90-2 (1934).
- 32 - FLASCHKA - EDTA titrations Pergamon Press Londres - New-York - Paris.
- 33 - FLITMAN R., FRIEDEN E. - J. Am. Chem. Soc. 79 5. 198 (1957).
- 34 - FRIEDEN E., NAILE B. - Arch. Biochem. Biophys. 48 448-57 (1954).
- 35 - GELLEROVA A.A. - Aptechnoe Delo 2 n° 2 33-8 (1953).
- 36 - GEMMIL C.L. - J. Biol. Chem. 192 749 (1951).
- 37 - GEMMIL C.L., PLUNKETT R.L. - Arch. Biochem and Biophys 36 434 (1952).
- 38 - GEORGE P. - Advances in catalysis Biochem J. 60 310 (1955).
- 39 - GERO E. - Compt. rend. soc. biol. 141 566-7 (1947).
- 40 - GERO E. - Compt. rend. soc. biol. 145 362-3 (1951).
- 41 - GERO E., LE GALLIC P. - Bull. soc. chim. biol. 34 557 (1952).
- 42 - GERO E., LE GALLIC P. - Compt. rend. 234 145-7 (1952).
- 43 - GERO E. - Compt. rend. 236 541-43 (1952).
- 44 - GERO E. - Compt. rend. 235 397-9 (1952).
- 45 - GIRAL G. - J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 36 82-4 (1947).
- 46 - GIRI C.K.V., SESHAGIRIRAO P. - Proc. Indiana Acad. Sci. 24 B 264 - 78 (1946).
- 47 - GOSH - RAKSHIT - ebenda 289 15 (1937).
- 48 - GRAB W. - Klin. Wochschr 27 430-4 (1949).
- 49 - GRAY P.P. et STONE I. - U.S. Pat n° 2620 - 275 dec. 2. (1952).
- 50 - GRUSHKO Y.M. - Farmakol i Toksikol 17 n° 43-5 (1954).
- 51 - HACKSPILL L., BESSON J., HEROLD A. - Chimie minérale Tome 1 p. 225 presses Universitaires 1958.
- 52 - HARRIS L.J., MILLS I., INNES J.R.M. - Lancet 11 235-7 (1932).
- 53 - HAWORTH W.N., HIRST E.L., REYNOLDS J.W., VIERBELY J.L.S., SZENT-GYORGHYI A. - Nature 576 690 (1932).

- 54 - HERBERT R.W., HIRST E.L., PERCIVAL E.G.V., REYNOLDS R.J., SMITH F. - J. Chem. - Soc. 1270 (1933).
- 55 - HESS A.F., UNGER J. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med (1921-1922) 19 119.
- 56 - HOLTZ P. - Arch. exp. Pathol. Pharmacol Nauryn-Schmiedeberg's, 182 98 (1936).
- 57 - HOLTZ P., HEISE R. - Arch. exp. Pathol. Pharmacol Nauryn-Schmiedeberg's 186 269 (1937).
- 58 - HOLTZ P., TRIEM G. - Z. physiol. Chem. Hoppe Seyler's 248 1 (1937).
- 59 - HUELIN F.E., STEPHENS I.M. - Nature 158 703 (1946).
- 60 - HUELIN F.E., STEPHENS I.M. - Australian J. Sci Research. 50-7 (1948).
- 61 - HUSZAK S. - Z. physiol. Chem. Hoppe Seyler's 247 239 (1937).
- 62 - IVANTSCHIEFF G. - Das dithizon und seine anwendung in der miko und spurenanalyse - Verlag chemie (1958) p.38-39.
- 63 - JAGER H. - Pharmazie 3 536 (1948).
- 64 - KAUFMANN H. - J. Amer. Soc. 73 4311 (1951).
- 65 - KAWERAN E., FEARON W.R. - Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. 23 171-80 (1944).
- 66 - KELLIE A.E., ZILVA S.S. - Biochem J. 29 1028-35 (1935).
- 67 - KIMURA S., SHIBATA T. - J. Utilization Agr. Prod. 1 95 (1954).
- 68 - KIRSON B., BARSILY I. - Bull. soc. chim. de France 6 901 (1959).
- 69 - KOBER - SUGIURA - J. Biol. Chem. 13 1 (1912).
- 70 - KOCH J., DIEMAIR W. - Pharmazie 3 104-107 (1948).
- 71 - KOICHIRO HOUDA - KAZUO MIURA - TAIKI TOMAOKI - J. Agr. Chem. Soc. Japan 26 453-6 (1952).
- 72 - LAMPITT L.H., CLAYSON D.H.F., BARNES E.M. - J. Soc. Chem. Ind. (London) 63 193 (1944).
- 73 - LAMPITT L.H., CLAYSON D.H.F., BARNES E.M. - Biochem J. 63 193 (1945).
- 74 - LEY H. - Z. Elektrochem 10 (1904).
- 75 - LIEBHAFSKY H.A., WINSLOW E.H. - J. Am. Chem. Soc. 59 1966-71 (1937).
- 76 - LYMAN M., SCHULTZE O., KING G. - J. Biol. Chem. 118 757-764 (1937).
- 77 - MACK G.L., KERTESZ Z.I. - Food Research 1 377 (1936).
- 78 - MAPSON L. - Biochem J. 39 228 (1945).
- 79 - MARTINI E. - BONSIGNORE A. - Biochem Z. 273 170 (1934).
- 80 - MARTINI E., BONSIGNORE A. - Boll. Soc. Ital. biol. Sper. 21 - 119 120 (1946).
- 81 - MARTELL, CALVIN - Chemistry of metal chelates compounds Prentice Hall p. 512.
- 82 - MATHEWS - WALKER - J. Biol. Chem. 6 21 29 299 (1909).

- 83 - MATSUKAWA D. - J. Biochem (Japan) 32 257 (1940).
- 84 - MAURINA F.A., DEAHL N. - J. Am. Pharm. Assoc. 32 301 - 6 (1943).
- 85 - MAWSON C.A. - John Burford Cartill Laboratoires Westminster Hospital Medical School S.W.L. (1935).
- 86 - MAYNARD A., MILLER J.J. - Food Research 14 325-39 (1949).
- 87 - MOMMAERTS (W.F.H.M.) - Vitaminforschung 14 312 (1944).
- 88 - MOREL A., CORDIER V., ENSELME J. - Trav. membres soc. chim. biol. 23 1449-56 (1941).
- 89 - MORGAN - DREW - J. Chem. Soc. 117 1456 (1920).
- 90 - MYERS R., ZETTLEMOYERS A. - Ind. Eng. Chem. 46 2220 (1954).
- 91 - NAKAMURA S., HEMMI H. - J. Agr. Chem. Soc. Japan 19 603 - 10 (1943).
- 92 - NIKOLAIEV L.A. - Vestnik Moskov Univ. 105 (1946).
- 93 - NOFRE C., CIER A., DREVON B. - Bull. soc. chim. de France 2 245 (1960).
- 94 - OKUDA H. - Med. J. 58 n° 4 2-3 (1939).
- 95 - OKUDA H. - Chem Zentr. 1 1692 (1940) 2 786 (1940).
- 96 - OLIVETTI L. - Biochim. e. terap. sper. 30 36 - 40 (1943) Chem Zentr.
- 97 - PAGE F.M. - Trans Faraday Soc. 51 919-25 (1955) 1 2001 (1943).
- 98 - PASQUIER F., MACHEBOEUF M. - Ann inst Pasteur Août 1950 - Tome 79.
- 99 - PASQUIER F., MACHEBOEUF M. - Ann inst Pasteur 85 803 - 4 (1953).
- 100 - PECHERER B. - J. Am. Chem. Soc. 3827 (1951).
- 101 - PETERSON R.W., WALTON J.H. - J. Am. Chem. Soc. 65 1212 (1943).
- 102 - PETROSINI G. - Arch. sci. biol. (Bologna) 31 182 (1946).
- 103 - PIANA C. - Atti. soc. ital. vet. 6 104-7 (1952).
- 104 - PYRIE A., VAN HEYMINGEN R. - Nature 173 873 (1954).
- 105 - REIF G. - Milchwirtsch. Forsch. 21 1 - 9 (1941) Chem. Zentr. 2 1340 (1941).
- 106 - SANDEGREN E. - Compt. rend. Congrès E.B.C. Lucerne (1949) 1-78.
- 107 - SCARBOROUGH D.A., WATTS B.M. - Foot technol. (1949) 3 152.
- 108 - SCHLEMMER F., CALOMANN H. - Deut. Nahrungsm Rundschau 182 - 3 (1932).
- 109 - SCHUMMER H. - Biochem Z. 304 1 - 17 (1940).
- 110 - SCHWARZENBACH G. - Komplexometrische titration (1957).
- 111 - SHIGERO IKEDA - HIDEHIRO GOTO - Sci. Repts - Research Inst Tohoku Univ. Ser. A vol. 7 (1955).
- 112 - SIEFFERT L. - Z. Vitaminforsh 17 52-73 (1946).
- 113 - SOMOGYI J.C. - Z. Vitaminforsch 16 134-68 (1945).

- 114 - STADTMANN E.R. - Amino acid metabolism Baltimore 418 (1955).
- 115 - STATHIS E.C. - Anal. Chem. Greece 20 271 (1948).
- 116 - STEINMANN H.G., DAWSON C.R. - J. Amer. Chem. Soc. 64 1212 (1942).
- 117 - STRAUB F.B. - physiol. Chem. H oppe Seyler's 254 192 (1938).
- 118 - STROEHECKER R., BUSSE A., WEINREICH A. - Z. Untersuch Lebensm 81 - 126 - 34 (1941).
- 119 - SZENT A. - GYORGYI - Biochem J. 22 1387 (1928).
- 120 - SZENT A. - GYORGYI - J. Biol. Chem. 90 385-93 (1931).
- 121 - SZENT A. - GYORGYI - Nature 129 690 (1932).
- 122 - TAUBER H., KLEINER I.S., MISHKIND D. - J. Biol. Chem. 110 211-18 (1935).
- 123 - TAUBER H. - Enzymologia 1 - 209 (1936).
- 124 - THUILLIER G. - Bull. soc. chim. de France 10 1431 Oct. 1959.
- 125 - TILLMANS J. - Z Untersuch. Lebensm. 63 267 (1932).
- 126 - TRAUBE M. - Ber. deut. chem. Ges. 15 659 (1882).
- 127 - UDENFRIEN S., CLARK C.T., AXELROD J., BRODIE B.B. - J. Biol. Chem. 208 731 (1954).
- 128 - URION E. & CHAPON L. - Brasserie 82 p. 117 (1953).
- 129 - URION E., CHAPON L., METCHE M. - Bull. soc. chim. biol. 38 1217 (1956).
- 130 - URION E., CHAPON L., CHAPON S., METCHE M. - Compt. rend. Congrès E.B.C. - Copenhagen 1957 Compt. rend. Congrès E.B.C. - Rome 1959.
- 131 - WARBURG-SUKUMA O. - Arch. ges. Physiol. Pflüger's 200 203 (1923) Biochem Z 142 68-78 (1923).
- 132 - WARBURG O. - Biochem Z 187 255 (1927).
- 133 - WARREN F.L. - Biochem J. (London) 37 338 (1943).
- 134 - WATANABA K. - J. soc. Trop. Agr. Taihoku Imp. Univ. 8 381 (1937)
- 135 - WAUGH W.A. & KING C.G. - J. Biol. Chem. 97 325-31 (1932).
- 136 - WELCHER - Organic Analytical Reagents vol. 11 page 180-200.
- 137 - YUSUKA SUMIKI - HIROSHI HAYASHI - J. Agr. Chem. Soc. Japon 23 1 - 5 (1949).
- 138 - DE CLERCK (J.) Bull. Assoc. Anc. de Louvain (1934) 34, 55, 78 Wochsohr Brau. 51, 378 (1934) J. Inst. Brewing 40 407 (1934).
- 139 - CECIL R., Mc PHEE J.R. - Advances in protein chemistry vol. XIV p. 258 (1959).
- 140 - HASTINGS A.B. (1943) In proteins, aminoacids et peptides E.J. COHN et J.T. EDSALL (eds) p. 85 REINHOLD co New York.
- 141 - SIDGWICK N.V. (1950) The chemical elements and their compounds p. 875 oxford Univ. Press. London and New-York.
- 142 - PASCAL I. (D.S.) TARBELL - J. Am. Chem. Soc. 79 6015 (1957).

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	
I - ORIGINE DE NOS TRAVAUX.....	7
II - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	8
A - Importance de l'acide ascorbique.....	8
B - Historique des travaux concernant l'oxydation de l' AH_2	9
C - Problèmes posés par l'oxydation de l' AH_2	10
1/ Autoxydation de l' AH_2	10
2/ Action du cuivre sur l' AH_2	11
3/ Action des autres cations.....	11
4/ Quantité d'oxygène fixé	11
5/ Formation d'eau oxygénée.....	11
6/ Réversibilité du système acide ascorbique, acide déhydroascorbique.....	12
7/ Inhibition de l'activité catalytique du Cu.....	12
D - Acide ascorbique et bleu de méthylène.....	13
PRESENTATION DES RESULTATS DE NOS RECHERCHES-INTER- PRETATION DES PHENOMENES.....	15
PARTIE EXPERIMENTALE	
CHAPITRE I - TECHNIQUES EXPERIMENTALES.....	25
I - Mesures colorimétriques.....	25
II - Préparation & conservation des solutions.....	28
III - Remarques sur le soin apporté aux manipulations.....	30
IV - Mesures manométriques de consommation d'oxygène par la méthode de Warburg.....	31

	Pages
CHAPITRE II - ETUDE DE L'ACTION DU CUIVRE.....	33
I - ACTIVITE CATALYTIQUE DU CUIVRE.....	33
A - Stabilité des solutions.....	33
1/ Conservation sous azote.....	33
2/ Conservation à l'obscurité.....	34
3/ Vieillessement des solutions.....	35
B - Sensibilité des solutions.....	35
1/ Influence de la concentration en AH_2	35
2/ Influence de la concentration en BM.....	38
3/ Influence du pH.....	39
4/ Choix des réactifs.....	41
C - Microdosage du cuivre en solution minérale ne contenant que cet ion.....	42
1/ Courbe d'étalonnage du cuivre.....	42
2/ Précision de la méthode de microdosage du cuivre....	44
3/ Relation entre la concentration en BM et la concentration en cuivre.....	45
D - L'acide ascorbique oxydase.....	46
II - VITESSE D'OXYDATION DES SOLUTIONS ADDITIONNEES DE CUIVRE.....	47
A - Relation entre la vitesse d'absorption d'oxygène et la concentration en catalyseur.....	47
B - Relation entre la coloration des solutions et leur vitesse de consommation d'oxygène.....	49
III - INHIBITION DE L'ACTION CATALYTIQUE DU CUIVRE...	51
A - Généralités.....	51
B - Inhibiteurs sulphydrylés.....	53
1/ Etude comparative de l'action de doses croissantes de différents inhibiteurs sulphydrylés.....	53
2/ Influence de la durée de la catalyse sur la décoloration des solutions après addition de l'inhibiteur.....	53
3/ Etude de l'équilibre existant entre le cuivre et l'inhibiteur.....	58
C - Action des complexons.....	58
D - Action des acides aminés.....	59
E - Formation d'inhibiteurs par insolation.....	59
1/ Etude expérimentale.....	60
2/ Nature possible des inhibiteurs.....	61
3/ Conclusions.....	61
F - Inhibiteurs contenus dans les solutions d' AH_2 additionnées de BM.....	62

	Pages
CHAPITRE III - ETUDE DE L'ACTION D'AUTRES CATIONS.....	65
<u>Action du fer</u>	
I - ACTIVITE OXYDASIQUE DU FER.....	66
A - Vérification de l'activité du fer.....	66
B - Variation au cours du temps de la coloration des solutions additionnées de fer.....	67
C - Courbes de sensibilité du fer.....	67
1/ Relation entre la transmission à l'équilibre et la concentration en fer.....	67
2/ Relation entre la concentration en BM et la con- centration en fer.....	68
D - Augmentation de l'effet catalytique du fer en pré- sence de complexon : microdosage du fer.....	68
II - ACTIVITE PEROXYDASIQUE DU FER.....	70
III - VITESSE D'OXYDATION DES SOLUTIONS ADDITIONNEES DE FER.....	71
<u>Action de l'argent</u>	
A - Vérification de l'activité de l'argent.....	73
B - Variation au cours du temps de la coloration des solutions additionnées d'argent.....	74
C - Courbes de sensibilité à l'argent.....	75
<u>Action de quelques autres cations</u>	75
<u>Influence de la présence d'autres cations sur les microdosages de cuivre et de fer</u>	77
I - MICRODOSAGE DU CUIVRE.....	77
II - MICRODOSAGE DU FER EN PRESENCE D'EDTA.....	78
III - POSSIBILITE D'UN MICRODOSAGE SELECTIF DES CA- TALYSEURS D'OXYDATION DE L' AH_2	80
CHAPITRE IV - FORMATION ET ACCUMULATION D'EAU OXY- GENEE AU COURS DE L'OXYDATION CATALY- TIQUE DE L' AH_2	31
I - FORMATION ET ACCUMULATION D' H_2O_2 AU COURS DE L'OXYDATION DE LA SOLUTION DE BASE PAR LE CUIVRE-POUVOIR PEROXYDASIQUE DU CUIVRE.....	82
II - FORMATION ET ACCUMULATION D' H_2O_2 AU COURS DE L'OXYDATION DE LA SOLUTION DE BASE PAR LE FER, -POUVOIR PEROXYDASIQUE DU FER.....	85
III - ETUDE DE QUELQUES PHENOMENES RELATIFS A LA FORMATION D' H_2O_2	87
A - Rapport entre la quantité d'oxygène absorbé et la quantité d' AH_2 oxydé.....	87
B - Le système oxydant acide ascorbique oxygène.....	88

	Pages
CHAPITRE V - ETUDE DES REACTIONS QUI GOUVERNENT LA CONCENTRATION EN BM.....	89
I - REDUCTION DU BM.....	89
A - Ordre de la réaction.....	89
B - Influence de la lumière.....	90
C - Action du Cu et du Fe sur la réduction de BM par AH_2 ...	91
II - FORMATION DU BLEU DE METHYLENE	
A - Catalyse par le cuivre.....	91
1/ Phase oxydasique.....	91
2/ Phase peroxydasique.....	91
B - Catalyse par le fer.....	94
a) <u>les ions libres</u>	94
1/ Phase oxydasique.....	94
2/ Phase peroxydasique.....	94
b) <u>les complexes du fer</u>	94
CONCLUSIONS	97

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

STRUCTURE CELLULAIRE ET REGULATION DU METABOLISME OXYDATIF

Vu et approuvé

Nancy, le 29 Juin 1961

Le Doyen de la Faculté des Sciences :

M. ROUBAULT

Vu et permis d'imprimer

Nancy, le 30 juin 1961

Le Recteur

Président du Conseil de

l'Université de Nancy

P. IMBS

IMP. LOUIS-JEAN — GAP

Dépôt legal n° 31 — 1962

